

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA VIEIRA GUEDES

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE GÉIS
PRODUZIDOS À BASE DE CASEINOMACROPEPTÍDEO**

**CURITIBA
2012**

PAULA VIEIRA GUEDES

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE GÉIS
PRODUZIDOS À BASE DE CASEINOMACROPEPTÍDEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lys Mary Bileski
Cândido

**CURITIBA
2012**

Guedes, Paula Vieira
Caracterização reológica e ultraestrutural de géis produzidos à
base de caseinomacropeptídeo / Paula Vieira Guedes . – Curitiba,
2012.
133 f. : il., tab, graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor
de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos.

Orientadora: Lys Mary Bileski Cândido

1. Derivados do leite - Processamento. 2. Soro do leite. I. Cândido,
Lys Mary Bileski . II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 637.14

PAULA VIEIRA GUEDES

**CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE
GÉIS PRODUZIDOS À BASE DE CASEINOMACROPEPTÍDEO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora:



Prof^a. Dr^a. LYS MARY BILESKI CÂNDIDO
Campus Francisco Beltrão, UTFPR



Prof^a. Dr^a. CÉLIA REGINA CAVICHIOLO FRANCO
Setor de Ciências Biológicas, UFPR



Prof^a. Dr^a. AGNES DE PAULA SCHEER
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 24 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

À minha família – pais e irmãos: Eduardo, Tania, em especial ao Fabinho. Por fazerem parte da minha vida e certamente estimularem para que eu vá em frente.

À Prof.^a Dr.^a Lys Mary Bileski Cândido, pela orientação, compreensão e determinação.

Ao Prof.^o Dr. Rilton Alves de Freitas e alunos integrantes do laboratório de Biopolímeros do departamento de Química, pelo ensinamento sobre reologia.

À Prof.^a Dr.^a Célia Regina C. Franco, do departamento de Biologia Celular, pelo subsídios em microscopia eletrônica.

Ao Prof.^o Dr. Fontana, do departamento de Farmácia, e ao técnico do laboratório Maurício Passos pela amizade e companheirismo.

Ao técnico do laboratório de pós do departamento de Nutrição, Jair José de Lima pela amizade e contribuição sempre que precisei.

À Técnica de laboratório do departamento de Nutrição Ms. Lindamir T. Tullio, pela contribuição em laboratório.

À coordenação e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Em especial ao secretário Paulo e ao técnico do laboratório Marcelo.

A todos os colegas e amigos que contribuíram para a concretização deste trabalho e para os momentos de descontração. Em especial, Barbi (Bárbara), Bobbito (Bogdan) e Luana.

**“Nenhuma tarefa, executada corretamente,
é realmente particular.
É parte do trabalho do mundo”.**

Woodrow Wilson

RESUMO

Peptídeos biologicamente ativos a partir do soro do leite, tais como o caseinomacropeptídeo (CMP), são de grande interesse na tecnologia de alimentos para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais. O CMP é derivado da k-caseína pela clivagem da enzima quimosina durante o fabrico do queijo. O CMP é liberado no soro e o restante da k-caseína, a para-k-caseína precipita junto a coalhada do queijo. O CMP possui funcionalidade tecnológica como elevada solubilidade, propriedades emulsificante e geleificante. Neste trabalho o objetivo foi isolar o CMP do soro de leite, caracterizar, desenvolver um produto de formato gel e estudar sua reologia. Foi utilizado o método de ultrafiltração em membrana de 50, 30 e 5 kDa e cromatografia de troca-iônica. A fração de CMP isolada por ultrafiltração apresentou teores de proteína de 23,7%; lactose 12% e ácido siálico 2,53%. No isolamento por cromatografia de troca-iônica obteve-se 66% de proteína, 10,57% de lactose e 3,53% de ácido siálico. O rendimento foi respectivamente de 58,33% e 100%. O perfil cromatográfico de acordo com o padrão, obtido por CLAE-FR, foram as frações do retentado de 30 kDa que foi ultrafiltrado e ficou retido em membrana de 5 kDa (R5R30) e F2. A fração F2 apresentou maior concentração dos picos característicos de CMP. O gel que possui concentração de 30% de isolado proteico de soro de leite (WPI), apresentou estrutura mais forte, com maior valor de módulo elástico (G'). Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostrou-se um padrão regular na morfologia, estruturas lamelares distribuídas sobre a superfície e porosidades distribuídas de forma homogênea. O gel com concentração de 50% de proteína: 30% de WPI e 20% de retentado de 30 kDa (R30) possui estrutura fraca e apresenta menor valor de módulo elástico (G'). Na eletromicrografia apresentou estruturas grosseiras com aglomerações de agregados e aspecto mais denso em sua superfície. O gel enriquecido com a concentração de 50% de proteína: 30% de WPI e 20% de R5R30 evidencia uma deposição maciça em material particulado e aglomerado por toda a superfície tornando o relevo muito irregular, além de apresentar força estrutural intermediária em relação aos demais géis. Apesar do aumento da concentração de proteína com adição da fração de CMP, ocorreu a diminuição na força de rede do gel.

Palavras-chave: Isolado protéico de soro de leite (WPI). Ultrafiltração. Cromatografia de troca-iônica. Reologia. Gel. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

ABSTRACT

Biologically active peptides from milk whey, such as caseinomacropeptide (CMP), are of great interest in the food technology for the development of new functional food. The CMP is derived from κ -casein by chymosin enzyme cleavage in the manufacture of cheese. The CMP is released in the serum and the rest of κ -casein, the para- κ -casein precipitates along the curd cheese. The CMP possesses technological functionality and high solubility, emulsifying and gelling properties. In this work the objective was to isolate the CMP from whey, characterize, develop a product in gel form and study their rheology. The method has been used in ultrafiltration membrane 50, 30 and 5 kDa, and ion exchange chromatography. The fraction of CMP isolated by ultrafiltration of protein content was 23.7%, 12% lactose and 2.53% sialic acid. In the isolation by ion exchange chromatography gave 66% protein, 10.57% lactose and 3.53% of sialic acid. The yield was 58.33%, respectively, and 100%. The chromatographic profile according to the pattern obtained by RP-HPLC, the fractions were R5R30kDa and F2. The F2 fraction showed the highest concentration of peaks characteristic of CMP. The gel which has a concentration of 30% WPI, showed stronger structure, with higher values of elastic modulus (G'). In SEM, showed a regular pattern in the morphology, lamellar structures distributed over the surface and pores distributed homogeneously. The gel with a concentration of 50% protein, 30% of WPI and 20% of R30 has weak structure and has a lower value of elastic modulus (G'). In their electron structures presented with coarse aggregates and clumps of denser point on its surface. The gel with the enriched concentration of 50% protein, 30% of WPI and 20% of R5R30 shows a deposition of solid particles and agglomerated by making the entire surface relief very irregular, and provides structural strength in relation intermediate the other gels. Despite the increase in protein concentration with the addition of CMP fraction, there was a decrease in the strength of the gel network.

Keywords: Isolated whey protein (WPI). Ultrafiltration. Ion-exchange chromatography. Rheology. Gel. Scanning Electron Microscopy (SEM).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	CROMATOGRAMA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE.....	24
FIGURA 02	HIDRÓLISE DA KAPA-CASEÍNA.....	32
FIGURA 03	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO CASEINOMACROPEPTÍDEO	34
FIGURA 04	CURVA DE FLUXO (1) E PERFIL DE VISCOSIDADE (2) DE FLUIDOS COM COMPORTAMENTO NEWTONIANO E NÃO NEWTONIANO.....	48
FIGURA 05	GRÁFICO DE TENSÃO VERSO TEMPO.....	50
FIGURA 06	MÓDULO COMPLEXO $ G^* $	53
FIGURA 07	DEPENDENCIA DA FREQUENCIA COM A FORÇA ESTRUTURAL	56
FIGURA 08	CURVAS DE TENSÃO E DEFORMAÇÃO DE UM MATERIAL VISCOELÁSTICO.....	57
FIGURA 09	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SISTEMAS.....	59
FIGURA 10	FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA	64
FIGURA 11	FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO CMP POR ULTRAFILTRAÇÃO.....	67
FIGURA 12	EQUIPAMENTO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	68
FIGURA 13	IMAGEM DA COLUNA COM RESINA E SOLUÇÃO UTILIZADA PARA O ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	69
FIGURA 14	FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	70
FIGURA 15	AMOSTRAS APÓS TRATAMENTO EM BANHO-MARIA.....	75
FIGURA 16	REÔMETRO TIPO CONE E PLACA UTILIZADO PARA ANÁLISE.....	76
FIGURA 17	TESTE DINÂMICO DE VARREDURA DE TENSÃO (A) E FREQUÊNCIA (B) EM FREQUÊNCIA CONSTANTE.....	77
FIGURA 18	FRAÇÕES RESULTANTES DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DO LEITE.....	84

FIGURA 19	GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SIÁLICO, PROTEÍNA E RELAÇÃO DESTES EM DIFERENTES ETAPAS DA ULTRAFILTRAÇÃO.....	85
FIGURA 20	GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SIÁLICO, PROTEÍNA E RELAÇÃO DESTES NAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	88
FIGURA 21	CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE CMP DA SIGMA-ALDRICH NA CONCENTRAÇÃO DE 10mg/mL.....	91
FIGURA 22	CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO F2 OBTIDA PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA, A 10mg/mL INJEÇÃO DE 30µL.....	92
FIGURA 23	AMPLIAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CROMATOGRAFIA DE SORO DE LEITE DE VACA COMUM MOSTRANDO OS MULTIPLOS PICOS DE CMP E O PICO DE CASOAMINOÁCIDO.....	93
FIGURA 24	CROMATOGRAFIA DO CMP COMERCIAL (LACPRODAN – CGMP-10 – ARLA).....	93
FIGURA 25	CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES F3 (A) E F4 (B) OBTIDAS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	94
FIGURA 26	CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO R5R30 OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	95
FIGURA 27	CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES R30 (A), SPD (B) E R5R30 (C) OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	96
FIGURA 28	CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO R5P30.....	97
FIGURA 29	CROMATOGRAMA DO WPI, PADRÃO DE CMP E SORO.....	98
FIGURA 30	ASPECTO DO GEL DE PROTEÍNA.....	101
FIGURA 31	MICROGRAFIA DOS GÉIS DE WPI E DAS FRAÇÕES DE CMP.....	112
FIGURA 32	IMAGENS 4, 5, 6 DOS GÉIS COM AUMENTO DE 3.000 X.....	113
FIGURA 33	IMAGENS 7, 8, 9 DOS GÉIS COM AUMENTO DE 10.000 X.....	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE DE VACA.....	19
TABELA 02	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE.....	28
TABELA 03	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA DUAS VARIÁVIES E TRÊS NÍVEIS (15 %, 20 %, 30 %) UTILIZADO NO EXPERIMENTO DO GEL DE PROTEÍNA.....	74
TABELA 04	VARIÁVEIS DO TRATAMENTO DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA.....	75
TABELA 05	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DOIS LOTES DE SORO DE LEITE EM PÓ UTILIZADO COMO MATÉRIA-PRIMA PARA EXTRAÇÃO DO GMP.....	80
TABELA 06	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISOLADO PROTEICO DO SORO DE LEITE (WPI).....	82
TABELA 07	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES DAS ETAPAS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	83
TABELA 08	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NAS FRAÇÕES DO PROCESSAMENTO DO SORO DE LEITE.....	84
TABELA 09	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MASSA EM BASE SECA DAS FRAÇÕES LIOFILIZADOS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	86
TABELA 10	CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NOS VOLUMES DAS ETAPAS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	88
TABELA 11	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MASSA EM BASE SECA DAS FRAÇÕES LIOFILIZADOS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	89

TABELA 12	VARIÁVEIS DO TRATAMENTO DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA COMPOSTA DE WPI.....	99
TABELA 13	VARIÁVEIS DO TRATAMENTO NO TEMPO DE 30 MINUTOS DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA COMPOSTA DE ISOLADO DE CMP E WPI.....	100
TABELA 14	VALORES DO MÓDULO ELÁSTICO (G') NA RVL.....	104
TABELA 15	LINEARIDADE DE TENSÃO ENCONTRADA NA FREQUÊNCIA 0,05 E 10 Hz.....	105
TABELA 16	VALORES DE MODULO DE CISALHAMENTO DE ARMAZENAMENTO OU ELASTICO (G'), MODULO DE CISALHAMENTO DE PERDA OU VISCOSO (G''), TANGENTE (δ) E VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*) NA FREQUÊNCIA DE 1 HZ.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

δ	ângulo de fase (°)
ω	frequência angular (rad/s)
λ_0	comprimento de onda (nm)
$\dot{\gamma}$	taxa de cisalhamento (s ⁻¹)
τ	tensão de cisalhamento (Pa)
η	viscosidade dinâmica (Pa.s)
η^*	viscosidade complexa (Pa.s)
pH	potencial hidrogeniônico
k-caseína	kappa-caseína
Arg	arginina
Ala	alanina
a-la	α -lactalbumina
Asp	ácido aspártico
b-Ig	β -lactoglobulina
BSA	soroalbumina bovina
CMP	caseinomacropéptido
CDP	peptídeo derivado da caseína
CLAE-FR	cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
DF	diafiltração
DLS	espalhamento de luz dinâmico
DSC	calorimetria diferencial exploratória
EDTA	ácido etileno diamino tetra acético
f	frequência (Hz)
G^*	módulo complexo (Pa)
G'	módulo elástico (Pa)

G''	módulo viscoso (Pa)
Gal	galactose
Glu	ácido glutâmico
Gly	glicina
GMP	glicomacropeptídeo
CMPA	caseinomacropeptídeo da variedade genética A
CMPB	caseinomacropeptídeo da variedade genética B
gCMP	forma glicosilada do caseinomacropeptídeo
aCMP	forma não-glicosilada do caseinomacropeptídeo
Met	metionina
Ileu	isoleucina
IEP	índice de eficiência protéica
LG	imunoglobulina
Lys	lisina
Leu	leucina
NaCl	cloreto de sódio
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MF	microfiltração
<i>n</i>	índice de comportamento de fluxo
OI	osmose inversa
Phe	fenilalanina
His	histidina
PKU	fenilcetonúria
PAC	contagem de área total dos picos
Pro	prolina
pI	ponto isoelétrico
RVL	região viscoelástica linear
Tyr	tirosina
T	temperatura (°C)

<i>t</i>	tempo
Thr	treonina
TCA	ácido tricloroacético
Ser	serina
Tris	tris-hidroximetilaminometano
UF	ultrafiltração
Val	valina
WP	proteínas do soro
WPC	concentrado de proteína de soro
WPI	isolado de proteína de soro
F1	fração 1 do processo de cromatografia de troca iônica
F2	fração 2 do processo de cromatografia de troca iônica
F3	fração 3 do processo de cromatografia de troca iônica
F4	fração 4 do processo de cromatografia de troca iônica
R5P30	retentado da membrana de 5 kDa proveniente do permeado da membrana de 30 kDa do processo de ultrafiltração
R5R30	retentado da membrana de 5 kDa proveniente do retentado da membrana de 30 kDa do processo de ultrafiltração
R30	retentado da membrana de 30 kDa do processo de ultrafiltração
P30	permeado da membrana de 30 kDa do processo de ultrafiltração
R50	retentado da membrana de 50 kDa do processo de ultrafiltração
P50	permeado da membrana de 50 kDa do processo de ultrafiltração
P5P30	permeado da membrana de 5 kDa proveniente do permeado de 30 kDa do processo de ultrafiltração
R5P30	retentado da membrana de 5 kDa proveniente do permeado de 30 kDa do processo de ultrafiltração
SPD	amostra do processo de ultrafiltração com secagem por <i>spray dryer</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVO GERAL	18
1.2.1 Objetivos Específicos.....	18
2 FUNDAMENTO TEÓRICO.....	19
2.1 COMPONENTES DO LEITE	19
2.1.1 Gordura.....	20
2.1.2 Lactose	20
2.1.3 Sais.....	21
2.1.4 Proteínas do Leite.....	21
2.2 SORO DO LEITE	22
2.2.1 Proteínas do Soro do Leite	23
2.2.2 Benefícios da Proteína do Soro do Leite	24
2.2.3 Composição Protéica do Soro	28
2.2.4 Caseinomacropeptídeo.....	31
2.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE (WPI) E DO CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP).....	37
2.3.1 Concentrados e Isolados Protéicos de Soro de Leite	37
2.3.2 Métodos de Separação do CMP	38
2.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS.....	40
2.4.1 Sistemas Coloidais: Gel.....	40
2.4.2 Gel de Isolado Protéico de Soro de Leite (WPI)	41
2.4.3 Gel de CMP	43
2.5 DEFINIÇÃO DE REOLOGIA	45
2.5.1 Propriedades de Viscoelasticidade	49
2.5.2 Análise Oscilatórias	57
2.6 IMPORTÂNCIA DA REOLOGIA.....	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	62
3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES	62
3.2 EQUIPAMENTOS	62
3.3 METODOLOGIA	63

3.3.1 Isolamento do CMP por Ultrafiltração	65
3.3.2 Isolamento do CMP por Cromatografia de Troca Iônica	68
3.3.3 Composição Físico-química.....	70
3.3.4 Determinação do Ácido Siálico	71
3.3.5 Determinação da Lactose	72
3.3.6 Análise do Perfil do CMP das Frações do Soro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase-Reversa (CLAE-FR)	72
3.3.7 Preparação da Dispersão da Proteína.....	73
3.3.8 Preparação de Géis Induzidos pelo Calor	74
3.3.9 Comportamento Reológico dos Géis	76
3.3.10 Microestruturas do Gel.....	78
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA	80
4.2 ISOLAMENTO DO CMP POR ULTRAFILTRAÇÃO	82
4.3 ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA-IÔNICA	87
4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (CLAE-FR)	90
4.5 GEL DE PROTEÍNA.....	99
4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS DOS GÉIS.....	102
4.6.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias	102
4.7 MICROESTRUTURA DO GEL.....	110
4.7.1 Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Géis Formados a Partir da Polimerização das Proteínas (WPI/CMP) em Diferentes Concentrações.....	111
4.7.2 Descrição dos Resultados Encontrados na Técnica de Varredura de Quebra (Malha interna dos géis)	115
5 CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS.....	119
APÊNDICE.....	131

1 INTRODUÇÃO

O Caseinomacropeptídeo (CMP) ou Glicomacropeptídeo (GMP) é um peptídeo de alto valor agregado devido às suas propriedades funcionais tecnológicas e atividade biológica. No entanto, como constituinte do soro do leite, é tido como resíduo industrial do processo de fabricação do queijo.

Em busca de reduzir o problema do impacto ambiental e, em contrapartida, considerando que esse mesmo resíduo pode se transformar em matérias-primas benéficas à saúde, a literatura científica apresenta inúmeros processos para obtenção de produtos com elevado teor de proteína de soro do leite. A recuperação do CMP a partir do soro do leite tem recebido muita atenção como um novo produto para utilizações especiais e como meio para modificar as propriedades funcionais das proteínas de concentrados (WPC) ou isolados (WPI) do soro de leite (ABD EL-SALAM, 2006).

O CMP é um fragmento de peptídeos, formado pela ação de coalho sobre a kapa-caseína, que ao lado da beta-lactoglobulina (b-Ig) e α -lactalbumina (a-la) é o peptídeo mais abundante (20 e 25% das proteínas) em produtos de soro de leite doce. O CMP é uma fração heterogênea que pode ser separada por cromatografia de troca iônica e ultrafiltração em vários componentes de diferentes concentrações e tamanhos, dependendo da fonte e do método de preparação. O CMP representa a parte terminal de resíduo da kapa-caseína, da posição 106 (Met) até a posição 169 (Val) terminal (ABD EL-SALAM, 1996). É um peptídeo ácido com ponto isoelétrico (pI) de 4 a 5, é solúvel em água, ou seja, hidrofílico e tem carga líquida negativa, mesmo em baixos valores de pH (HARTLE e CHOBERT, 1999).

Este peptídeo não tem todos os aminoácidos aromáticos (Phe, Try, Tyr), o que direciona seu uso como um ingrediente primordial na formação de dietas para portadores de fenilcetonúria (PKU) (SMITHERS *et al.*, 1991). Por outro lado, o CMP é rico em aminoácidos de cadeia ramificada (valina e isoleucina) e possui baixo teor em metionina. Isso faz o CMP particularmente útil no controle de doenças de fígado, onde vários aminoácidos de cadeia ramificada parecem ser utilizados como uma fonte de energia.

Tem sido relatado que o CMP exibe várias atividades biológicas, tais como a capacidade para ligar enterotoxinas, impedir a adesão bacteriana e viral, modular as respostas do sistema imunológico, promover crescimento de bifidobactérias, suprimir a secreção gástrica, e inibir a agregação de plaquetas (ABD EL-SALAM, 1996). Estes efeitos do CMP, que melhoram a saúde, poderiam promover exploração suplementar do soro de queijo para o desenvolvimento de alimentos ou ingredientes funcionais, podendo, assim, ser incluído na composição dos produtos alimentares inovadores.

A caracterização das diferentes formas de CMP para ensaios de bioatividade, bem como a determinação do rendimento dos processos para a produção de CMP, requer sofisticada técnica analítica, tendo em vista a heterogeneidade dessas moléculas. Tais técnicas podem ser aplicadas para o estudo das mudanças na estrutura molecular do CMP induzida pelo processamento, que podem dar origem a alterações na bioatividade.

O CMP é uma fonte de proteína que garante potencial industrial. Sua estabilidade térmica original e solubilidade em condições ácidas podem sugerir várias utilizações em alimentos. As proteínas são agentes de estruturação e, portanto, sua inclusão influencia a reologia em matrizes de alimentos. Para a produção de produtos inovadores, bioativos e de funções tecnológicas, o CMP poderia ser utilizado para tais desempenhos. Porém, há pouca informação sobre a propriedade funcional tecnológica do CMP e sua incorporação nas matrizes dos alimentos (THOMA-WORRINGER *et al.*, 2006)

Com a falta de produto com CMP a ser desenvolvido no mercado e com a intenção de aproveitamento do soro, é proposto nesse trabalho o seu isolamento e caracterização a partir do soro de leite, desenvolvimento de gel, estudo reológico desse estado físico e utilização como coadjuvante na indústria ou como produto final.

1.1 JUSTIFICATIVA

O Caseinomacropeptídeo, assim como as proteínas do soro, pode ser utilizado em inúmeras aplicações na indústria de alimentos por oferecer uma série de benefícios funcionais e aplicações tecnológicas. No presente trabalho, foi utilizada a propriedade de geleificação destas proteínas para a elaboração de um alimento para fim especial.

1.2 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de um produto na forma de gel à base de caseinomacropeptídeo.

1.2.1 Objetivos Específicos:

- a) Determinar a composição físico-química do soro em pó proveniente da região oeste do Paraná;
- b) Isolar o Caseinomacropeptídeo (CMP) do soro do leite por cromatografia de troca iônica e ultrafiltração;
- c) Determinar a composição físico-química do CMP e WPI (isolado protéico do soro) que serão matérias-primas do gel;
- d) Caracterizar o perfil em cromatografia líquida de alta eficiência do soro, do CMP e WPI;
- e) Desenvolver diferentes misturas de gel derivado do CMP e WPI;
- f) Determinar o comportamento reológico dos diferentes géis derivados do CMP e WPI sob o efeito da concentração do polímero, da temperatura e do tempo no comportamento reológico;
- g) Analisar as ultraestruturas dos géis por microscopia eletrônica.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 COMPONENTES DO LEITE

A água é o componente mais abundante no leite, no qual se encontram em solução os demais compostos. Alguns minerais apresentam-se na forma de solução iônica, a lactose e a albumina aparecem como solução verdadeira, a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal e a gordura na forma de pequenos glóbulos dispersos, constituindo uma emulsão (TRONCO, 2008). Pode-se dizer de outra forma que, o leite é uma emulsão de gordura em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína em uma solução de sais, vitaminas, peptídeos e outros componentes menores.

O leite apresenta pH de 6,5 a 6,7 e viscosidade ao redor de 2 cP devido à presença de gordura e micelas de caseína (PEREIRA *et al.*, 2001). O pH do leite é dependente da temperatura, diminuindo com o aumento desta (WASTRA, 2001).

Apesar da maior proporção ser de gordura, é devido à qualidade das proteínas que o leite é consumido. A composição química aproximada do leite de vaca é apresentada na TABELA 01.

TABELA 01 – COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LEITE DE VACA

Constituinte	Teor (g/100g)	Teor no extrato seco (%)
Água	87,1	--
Lactose	4,6	36,0
Gordura	4,0	31,0
Proteínas	3,25	25,0
Caseína	2,6	20,0
Minerais	0,7	5,4
Ácidos orgânicos	0,17	1,3
Outros	0,15	1,2

FONTE: Adaptado de WALSTRA (2001).

2.1.1 Gordura

O componente lipídico do leite é formado por uma complexa mistura. Os triacilgliceróis são os mais importantes, compondo 98% das gorduras totais. Estes são compostos de três ácidos graxos em ligação covalente com molécula de glicerol por pontes éster (DURR, 2002). Os 2% restantes são compostos de diacilgliceróis, monoacilgliceróis, colesterol, fosfolipídeos, ácido graxo livre e cerebrosídeos. O conteúdo de gordura é a fração mais variável, sendo decorrente do tipo de espécie, raça, estágio de lactação, infecção mastítica entre outros (JENNESS, 1987; FOX, 2000).

2.1.2 Lactose

A lactose é o açúcar predominante e se encontra totalmente em solução verdadeira na fase aquosa do leite. Constitui a principal fonte de carbono da maioria dos microrganismos que crescem no leite (GUIZANI, 2007; WALSTRA; JENNESS, 1987).

É o açúcar do leite, e o componente presente em maior quantidade no soro. É definido quimicamente, como um dissacarídeo redutor composto pelos monossacarídeos glicose e galactose. A lactose possui duas formas isoméricas, a α -lactose e a β -lactose, que formam uma mistura em equilíbrio, na água a 20°C, nas proporções de 63% e 37%, respectivamente. O poder de doçura é menos intenso do que os outros açúcares (sacarose, glicose, frutose) (DA FONSECA, 2008).

Outros glicídeos podem ser encontrados no leite, porém em baixas concentrações, tais como: galactose, amino-açúcares, açúcar-fosfatos, oligossacarídeos e açúcares nucleotídeos (GONZÁLEZ, 2001).

2.1.3 Sais

Quase todos os sais do leite se encontram no soro e nas micelas de caseína, porém uma quantidade mínima aparece unida aos glóbulos de gordura. As micelas de caseína contêm fosfato de cálcio não dissolvido (ou coloidal) e traços de citrato. Íons como Ca^{2+} e Mg^{2+} se associam às proteínas carregadas negativamente, e em pequenas quantidades, o Cl^- também pode ser encontrado no leite. Este possui ainda na composição fósforo, na forma de ortofosfato e compostos de enxofre ($0,36 \text{ g.kg}^{-1}$) (DA FONSECA, 2008).

2.1.4 Proteínas do Leite

O conteúdo de proteína presente no leite varia de 3,0% a 3,6%, dependendo da alimentação, raça e idade da vaca. As proteínas são formadas por aminoácidos que se ligam por pontes dissulfeto, ligações hidrogênio, ligações peptídicas e iônicas. Formam estruturas polipeptídicas, unindo-se entre si e assim formando as proteínas (SPREER, 1991). Os aminoácidos essenciais, que devem ser obtidos mediante a alimentação, são: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, arginina e valina. Os aminoácidos não-essenciais, que podem ser sintetizados pelo organismo, são: alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutâmico, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina. (ANTUNES, 2003).

As proteínas do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. As propriedades nutritivas e tecnológicas provêm da composição de aminoácidos que atendem a maioria das exigências fisiológicas do ser humano (SWAISGOOD, 1982) e de suas características físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de fundamental interesse tecnológico. Tais são estas: a solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação de produtos (WONG *et al.*, 1996; MODLER, 2000).

As proteínas do leite podem ser classificadas em três grupos:

- a) Caseínas;
- b) Proteínas do soro, no qual se incluem as proteínas presentes em pequenas quantidades e enzimas;
- c) Proteínas associadas à fase lipídica, que são identificadas como componentes da membrana do glóbulo de gordura do leite (DA FONSECA, 2008).

Entre as proteínas, a caseína é a mais abundante, representando em torno de 80 a 85% das proteínas do leite. A kapa-caseína é uma fosfoproteína que possui ligações com cálcio, enxofre e oxigênio. As caseínas se agregam formando grânulos insolúveis chamados micelas, no entanto as demais proteínas estão em forma solúvel. Em pH 4,6 a 20°C precipita por acidificação do leite (ANTUNES, 2003; SGARBIERI, 1996).

2.2 SORO DO LEITE

Consiste em um líquido de coloração amarelada, que é separado da coalhada durante uma etapa na fabricação de queijo. Existem dois tipos de soro: o soro ácido (pH < 5,1) e o soro doce (pH > 5,6). O soro ácido é resultado da acidificação do leite com adição direta de ácido ou pela produção de ácido resultante da fermentação láctica. Já o soro doce é obtido após o tratamento do leite com a enzima quimosina, que age sobre a kapa-caseína a qual é hidrolisada em dois peptídeos. Assim é libertado o polipeptídeo C-terminal de 64 aminoácidos, tal qual é o caseinomacropeptídeo (DZIUBA & MINKIEWICZ, 1996; DA FONSECA, 2008).

Ambos os tipos de soro representam cerca de 85% a 90% do volume de leite utilizado no processamento de queijo, restando 55% dos nutrientes da matéria-prima.

A composição do soro é caracterizada por 94% de lactose do leite, 20% das proteínas e grande parte das vitaminas hidrossolúveis e sais minerais. Estes componentes são os responsáveis pelo alto índice de putrefação do soro do leite, propriedade esta que, em termos ambientais, torna obrigatório um sistema de tratamento (DA FONSECA, 2008). Perante isso, outra solução é direcionar esse

subproduto a outro destino de forma mais econômica e sustentável. Daí surge à idéia de reutilizá-lo como matéria-prima e coadjuvante tecnológico na indústria de alimentos.

No Brasil, a produção de bebidas lácteas é uma das principais opções de aproveitamento do soro de leite. As mais comercializadas são as bebidas fermentadas e as bebidas lácteas não fermentadas. Porém, o aproveitamento desse subproduto atinge somente 15% do total de soro produzido nacionalmente, que em 2002, foi estimado em 470 milhares de toneladas (CAPITANI *et al.*, 2005).

Segundo a LEITE BRASIL (2012), entidade da classe com sede em São Paulo, a produção de leite vai crescer 4% em 2012 e atingir 32,3 bilhões de litros. Se 30% do leite for utilizado para fabricação de queijo, e que para cada quilo de queijo são gerados nove litros de soro, o volume de soro proveniente exclusivamente desta atividade no Brasil, atingiria cerca de 8,7 bilhões de litros de soro.

2.2.1 Proteínas do soro do leite

Quando a caseína é removida, o líquido remanescente chama-se soro do leite ou soro do queijo. As proteínas do soro representam cerca de 15 a 20% das proteínas totais do leite. Estas são compostas pelas: beta-lactoglobulina (16 a 18%), α -lactoalbumina (2 a 4%), caseinomacropeptídeo, que juntas representam cerca de 90% do total das proteínas do soro; soroalbumina bovina (BSA), imunoglobulina (LG), lactoferrina, transferrina, lactoperoxidase e proteose-peptona (SPREER, 1991; MORR e HA, 1993; SGARBIERI, 1996).

Na análise cromatográfica, o tempo de retenção e contagem de área total dos picos (PAC) dos padrões do CMP, peptona proteose, da lactalbumina e b-lactoglobulina, está entre 4 a 8 min., 8 a 10 min., 10,5 a 11,5 e 12,5 e 13,5 min., respectivamente (TAYLOR, WOONTON, 2009).

A FIGURA 01 mostra o cromatograma do soro de leite constituído de seus picos de proteína. O pico 1 representa a albumina do soro bovino, o pico 2 é o caseinomacropeptídeo, o pico 3 é a α -lactoalbumina e o pico 4 refere-se a b-lactoglobulina.

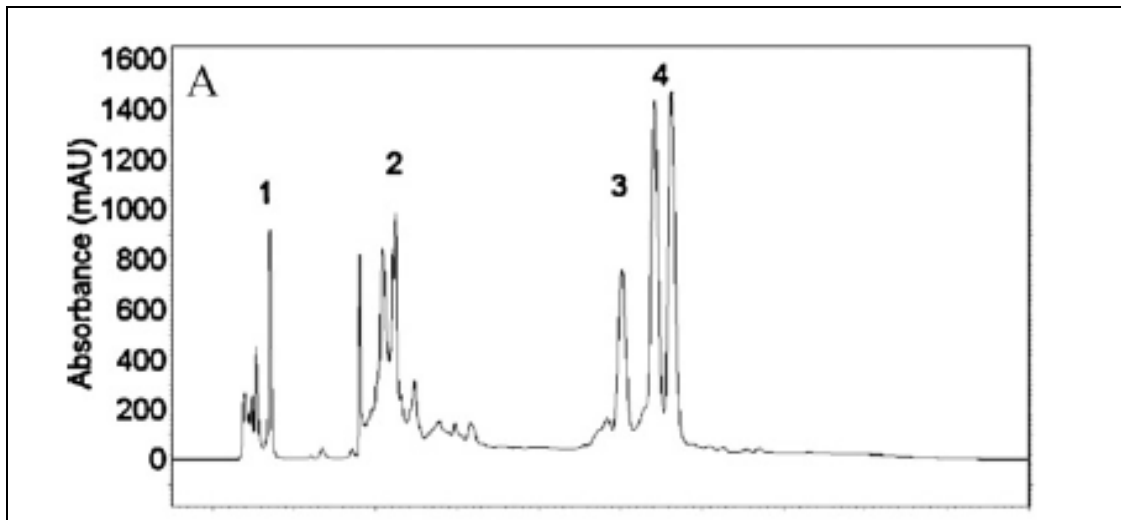


FIGURA 01 - CROMATOGRAMA DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE

FONTE: ALCÂNTARA *et al.*, 2011.

NOTA: Os picos de cromatografia são: albumina do soro bovino (1), caseinomacropeptídeo (2), α -lactoalbumina (3), β -lactoglobulina (4).

As proteínas encontradas no soro são conhecidas pela versatilidade de suas propriedades funcionais e tecnológicas. Principalmente, são distinguidas por sua elevada solubilidade e capacidade de geleificação. Em relação às propriedades funcionais fisiológicas, são eficientes no controle da modulação do metabolismo e no mecanismo de defesa do organismo (CAPITANI *et al.*, 2005).

2.2.2 Benefícios da Proteína do Soro do Leite

Estudos têm relatado que as proteínas do soro apresentam algumas vantagens em relação à caseína. Proteínas do soro e caseínas proporcionam metabolismo diferente. Ao atingirem o intestino delgado, as proteínas do soro são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando ligeiramente a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos. Devido a essa rápida absorção, essas proteínas não sofrem alterações conformacionais pela ação do ácido estomacal (PACHECO *et al.*, 2005).

As proteínas do soro são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais. Alguns

pesquisadores categorizam-nas como proteínas de metabolização rápida, que são adequadas para situações de estresse metabólico no qual a reposição de proteínas no organismo se torna emergencial (SGARBIERI, 2004). O IEP (Índice de Eficiência Protéica) é mais alto nas proteínas do soro (>3,0) do que na caseína (2,5) e no concentrado de proteína de soja (2,2). As proteínas com índice acima de 2,5 são consideradas proteínas de alta qualidade, o que classifica as proteínas do soro como excelentes proteínas em relação à eficiência nutricional (DA FONSECA, 2008).

Uma das propriedades funcionais fisiológicas mais estudadas e importantes das proteínas do soro de leite se relaciona com o seu poder imunomodulador. As imunoglobulinas do leite permanecem quase que integralmente no soro e continuam a desempenhar função importante, não somente no sistema gastrointestinal, mas sistemicamente em todo o organismo.

Pesquisadores canadenses associaram o poder imunoestimulantes das proteínas do soro com a capacidade dessas proteínas estimularem a síntese de glutathione, em virtude do elevado conteúdo de cisteína e de repetidas seqüências glutamyl-cystine na estrutura primária dessas proteínas (BOUNOUS *et al.*, 1991). Peptídeos com a sequência glutamyl-cystine seriam formados na digestão dessas proteínas e absorvidos como tal, servindo de substrato para a síntese de glutathione. Esta, por sua vez, exerce um poder estimulatório sobre linfócitos capazes de sintetizar imunoglobulinas.

Atividade antimicrobiana e antiviral têm sido demonstradas para as proteínas do soro de leite: lactoferrina, lactoperoxidase, α -lactalbumina e as imunoglobulinas.

SGARBIERI (2004) relatou as propriedades multifuncionais das proteínas presentes no soro de leite bovino, a começar pelo colostro que contém essas proteínas em concentrações muito elevadas e que tem por função garantir a proteção e a imunidade dos recém-nascidos. Essas mesmas proteínas continuam no leite, porém em concentrações bastante reduzidas. A utilização dessas proteínas na forma de concentrados e isolados protéicos evidencia propriedades muito favoráveis à saúde no sentido de diminuir o risco de doenças infecciosas, assim como as consideradas crônicas e/ou degenerativas. Pesquisadores enfatizaram as propriedades das proteínas do soro de leite: no estímulo ao sistema imunológico; na proteção contra microrganismos patogênicos e contra alguns tipos de vírus como o HIV e o vírus da hepatite C; na proteção contra vários tipos de câncer,

particularmente de cólon; na proteção da mucosa gástrica contra agressão por agentes ulcerogênicos. Eles também evidenciaram várias linhas de ação protetora das proteínas de soro contra agentes condicionadores de problemas cardiovasculares.

Além do concentrado e do isolado protéico de proteína de soro (WPC e WPI), a ação imunológica tem sido apresentada pelas proteínas isoladas do soro: imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase e caseinomacropeptídeo (CMP) (WALZEM *et al.*, 2002).

Pesquisa demonstrou a eficácia do permeado da ultrafiltração do soro de leite como fator de crescimento em meios de cultura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, que são probióticos utilizados na formulação de alimentos funcionais (SARON, 2004).

A α -lactalbumina tem o poder de elevar o triptofano sanguíneo, devido ao seu elevado teor de triptofano. Este é precursor do neurotransmissor serotonina e do hormônio neurosecretor melatonina, ao qual foram atribuídos efeitos comportamentais da ingestão dessa proteína no apetite, na saciedade, no humor, na percepção da dor e no ciclo de dormir e acordar (YOGMAN, 1982).

Pesquisadores vêm reconhecendo que as proteínas e peptídeos do soro do leite e destes derivados, poderão ter um alto valor no mercado e constituir-se em suplementos alimentícios valiosos na diminuição de riscos de doenças crônicas e degenerativas, bem como preciosos aliados dietoterápicos no tratamento de várias doenças (SGARBIERI, 2004).

Com base em várias propriedades funcionais das proteínas do soro do leite, ressalta-se a vantagem e os benefícios de seu uso como suplemento alimentar para atletas e esportistas. O fato é que, o exercício físico tem intenso efeito no metabolismo das proteínas, no consumo de O₂ acima dos níveis de repouso (VO₂ – volume de oxigênio que o corpo consegue captar, absorver e utilizar), no transporte de aminoácidos e de glicose, bem como na concentração de lactato muscular (TIPTON *et al.*, 1999; ROY *et al.*, 1997; BURKE, 2000).

Os aminoácidos e peptídeos, como precursores da síntese protéica, desempenham um papel fundamental no organismo. Tem-se observado que a

oxidação de leucina, em ratos treinados, é superior a de ratos não treinados. Portanto, o condicionamento físico aumenta a rotatividade e a oxidação da leucina, a qual é acelerada na medida em que o organismo esteja depletado de glicogênio (HENDERSON *et al.*, 1985).

O exercício físico, em geral, requer um maior aporte protéico, o que se deve a uma maior utilização de aminoácidos como fonte energética no metabolismo. Na atividade física, a diminuição da disponibilidade de aminoácidos pode limitar o efeito da insulina sobre a síntese tecidual de proteínas. O excesso na ingestão de proteínas pode, contudo, proporcionar efeitos negativos no metabolismo hepático e renal (BIOLO, 1999).

Dieta suplementada com mistura de proteínas de soro lácteo, parcialmente hidrolisadas e carboidrato foi capaz de estimular a secreção de insulina e aumentar os níveis de aminoácidos plasmáticos com maior eficiência que dietas suplementadas com proteína intacta (não hidrolisada) ou com apenas carboidrato (VAN LOON *et al.*, 2000). PIMENTA (2002) constatou que o grupo de ratos com dieta de hidrolisado de proteínas de soro apresentou melhor desempenho metabólico e foi significativamente mais resistente à exaustão que os ratos que receberam a dieta com proteínas de soro íntegras (não hidrolisadas).

O exercício físico exaustivo causa depressão imunológica, produção de radicais livres e catabolismo protéico. As proteínas do soro do leite e seus hidrolisados agem estimulando o sistema imune (celular e humoral) através do estímulo linfocitário e produção de anticorpos. Várias destas proteínas e seus produtos metabólicos são antioxidantes, sequestrantes de radicais livres e são rapidamente digeridas e absorvidas, além de que a composição de aminoácidos favorece a síntese de proteínas musculares (aminoácido de cadeias ramificadas). É de se esperar que sua ação seja altamente benéfica ao organismo humano e animal, antes, durante e após períodos de exercícios intensos e/ou prolongados (SGARBIERI, 2004).

Por outro lado, os concentrados protéicos de soro de leite (WPC) são sistemas multifuncionais que vêm sendo adicionados a vários alimentos, com o objetivo de modificar propriedades através de gelatinização, aumento da viscosidade e estabilização de emulsões e espumas (ANTUNES, 2003). Além disto, atletas utilizam concentrados protéicos na forma de pó ou líquidos, no entanto, não é visto

ainda no mercado gel a base de proteína do soro do leite, o qual é um formato frequentemente utilizado para ingestão de carboidratos durante exercícios de longa duração.

2.2.3 Composição Protéica do Soro

Concentrados protéicos de soro de leite (WPC) são constituídos por duas principais proteínas: beta-lactoglobulina (β -lg), representando 54% da massa de WPC e alfa-lactalbumina (α -la) contribuindo com 21% da massa total.

A TABELA 02 mostra algumas características físicas da maioria das proteínas do soro do leite.

TABELA 02 – CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE

Proteínas do Soro	Concentração (g/L)	Massa Molecular (Da)	Ponto Isoelétrico
β -lactoglobulina(monômero)	2,7	18.362	5,2
α -lactalbumina	1,2	14.147	4,5 – 4,8
Caseinomacropeptídeo	1,2 – 1,5	7.000	< 3,8
Imunoglobulinas	0,65	150.000– 1.000.000	5,5 – 8,3
Albumina de Soro Bovino	0,4	69.000	4,7 – 4,9
Lactoferrina	0,1	78.000	9,0
Lactoperoxidase	0,03	89.000	9,5

FONTE: Adaptado de ZYDNEY (1998).

2.2.3.1 β - Lactoglobulina:

É uma proteína globular consistindo de 162 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 18.000 Da. Possui duas ligações dissulfeto intermoleculares e

grupo tiol livre que é o principal responsável por sua agregação térmica irreversível e propriedades de formação de gel. Corresponde aproximadamente à metade das proteínas do soro e possui oito variantes genéticas. No ponto isoelétrico (pI), pH 3,5-5,2, os dímeros tendem a formar octâmeros, e em pH abaixo de 3,4 se dissociam em monômeros. No estado nativo é solúvel no pI, capaz de ligar compostos hidrofóbicos e formar gel, espuma e emulsão (GOFF, 2006; SCHMITT, 2011).

2.2.3.2 α -Lactoalbumina:

Também é globular, mas apresenta principalmente estrutura helicoidal secundária. Possui: massa molecular de 14.000 Da, 123 resíduos de aminoácidos, pI entre 4,2 e 4,5 e oito grupos de cisteína unidos por ligações dissulfeto. Possui uma elevada sensibilidade ao cálcio (CHRYSTINA, BREW e ACHARYA, 2000). Tem uma estrutura secundária esférica compacta e em pH de 6,6 ou mais, passa a existir como monômero (GOFF, 2006).

2.2.3.3 Soralbumina bovina (BSA):

Possui massa molecular de 69.000 Da, 582 resíduos de aminoácidos e um grupo sulfídrico (-SH) livre na posição 34 (n-terminal) além de 17 pontes dissulfeto intramoleculares (SGARBIERI, 1996).

2.2.3.4 Imunoglobulinas:

São proteínas produzidas pelos linfócitos B, que possuem alta massa molecular e propriedades físicas, químicas e imunológicas semelhantes (DA FONSECA, 2008). As imunoglobulinas são classificadas em: IgG (G1 e G2), IgA e

IgM, cada uma com sua função própria, as quais se ligam ao antígeno de forma específica acarretando em uma resposta imunológica (SGARBIERI, 1996).

2.2.3.5 Lactoferrina:

É uma metaloproteína que se liga a dois átomos de ferro por mol de proteína (PM 86.100). Devido ao seu conteúdo de ferro, essa proteína é muito resistente à desnaturação térmica, química e ação enzimática. Possui ponto isoelétrico (pI) de pH 8,0 (SGARBIERI, 1996).

A lactoferrina, bem como seu peptídeo lactoferricina, inibem a proliferação e o crescimento de bactérias, bem como de leveduras fungos e protozoários por quelar (seqüestrar) o ferro disponível no ambiente. A hidrólise enzimática da lactoferrina libera peptídeos com ação inibitória ao vírus da hepatite C e com ação contra a bactéria *Helicobacter pylori* (MCCANN, 2001). A lactoferricina, peptídeo formado dos resíduos 17-41, resultante da ação da pepsina sobre a lactoferrina, apresenta além da atividade antimicrobiana, ação apoptótica sobre células da leucemia humana (BELLAMY *et al.*, 1992; ROY *et al.*, 2002).

2.2.3.6 Lactoperoxidase:

Pertence ao grupo de enzimas peroxidases, as quais catalisam reações oxidativas onde o peróxido de hidrogênio está entre um dos reagentes. A lactoperoxidase tem propriedade bactericida através da oxidação de tiocianatos em presença de peróxido de hidrogênio (NABET, 2001). Seu ponto isoelétrico (pI) acontece em pH 9,6 e tem aplicação na indústria de alimentos ou outras, como antimicrobiano natural (DA FONSECA, 2008).

2.2.3.7 Proteose-peptona:

São 38 peptídeos da fração das proteínas do soro, que se caracterizam quimicamente por serem resistentes ao aquecimento de 95°C a 100°C durante 30 minutos e insolúveis em ácido tricloroacético (8 a 12%). Muitos destes peptídeos resultam da proteólise da β -caseína, por ação de proteinases ou da plasmina do leite (DA FONSECA, 2008).

2.2.4 Caseinomacropeptídeo

O caseinomacropeptídeo (CMP) não é uma proteína globular. O CMP é composto por 64 aminoácidos (8kDa) procedente da porção terminal hidrofílica da kapa-caseína, a qual contém todas as modificações pós-translacionais (glicosilação e fosforilação) presentes na kapa-caseína, que contribui para sua grande heterogeneidade (MIKKELSEN *et al.*, 2005).

A kapa-caseína bovina apresenta duas variantes genéticas, cuja diferença está presente na região do CMP. Conseqüentemente, o CMP contém dois grupos de peptídeos originados da kapa-caseína. O grupo A (CMPA) e o grupo da variedade B (CMPB) que diferem em resíduos de aminoácidos treonina ou isoleucina na posição 136 e no resíduo de ácido aspártico ou alanina na posição 148 (TOLKACH; KULOZIK, 2005).

O CMP também é referido como glicomacropeptídeo (GMP), ou como um peptídeo derivado da caseína (CDP). O CMP é caracterizado pela ausência de aminoácidos aromáticos. Portanto, não apresenta qualquer absorção a 280 nm e pode ser detectado apenas a 205-217 nm (ABD EL-SALAM, 1996). Por ter mais do que quatro resíduos de açúcar por molécula, apresenta um caráter parcialmente hidrofílico, enquanto sua cadeia de peptídeos possui mais propriedades hidrofóbicas. É um peptídeo ácido com pI entre 4,0 e 5,0, altamente solúvel e estável ao calor (THOMA-WORRINGER *et al.*, 2006).

Esse peptídeo C-terminal solúvel é formado mediante o uso da quimosina (renina) que causa a clivagem da kapa-caseína entre Phe105-Met106 durante a fabricação de queijo (SILVA *et al.*, 2009). Esta hidrólise da kapa-caseína libera um peptídeo insolúvel, a para-kapa-caseína N-terminal de 12 kDa que conserva-se na coalhada e a outra parte, o caseinomacropeptídeo, peptídeo solúvel C-terminal de 6,8 kDa, o qual permanece no soro. Esta reação é mostrada na FIGURA 02. O peptídeo CMP é inexistente no soro ácido, e possui 10% de sua massa em sacarídeos (DZIUBA; MINKIEWICZ, 1996; DA FONSECA, 2008).

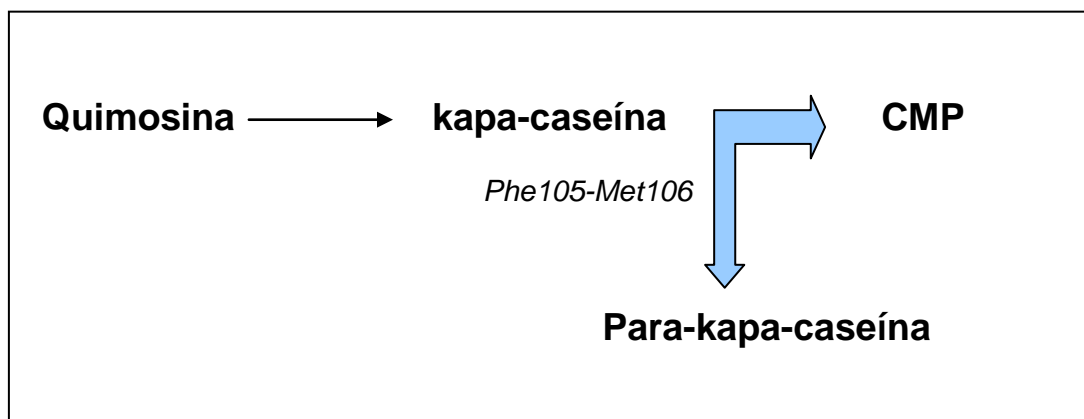


FIGURA 02 - HIDRÓLISE DA KAPA-CASEÍNA

FONTE: O AUTOR, 2012.

A estimativa é que o CMP ocorre em soro doce com cerca de 1,2-1,5 g/L que constitui entre 15 a 25% das proteínas totais do soro (ABD EL-SALAM, 2006). Ao lado da beta-lactoglobulina, lactoalbumina e do soroalbumina bovina, o CMP é a mais abundante proteína/peptídeo entre as proteínas do soro do leite (THOMA-WORRINGER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

Formas glicosiladas do CMP (gCMP) representam cerca de 50% do total do CMP (MOLLE; LEONIL, 2005) e contém todos os carboidratos originalmente presente na kapa-caseína. Os CMP isolados não-glicosilados (aCMP) tem massa molecular entre 6755-6787 Da, dependendo da variação genética. A massa molecular média do CMP total é de cerca de 7500 Da, e a maior massa de até 9631 Da correspondente ao CMP altamente glicosilado (gCMP) (MOLLE; LEONIL, 2005).

STAN e CHERNIKOV (1974) relataram que o CMP foi fracionado por coluna cromatográfica em componentes com tamanho de 32 e 8 mol kDa. O CMP parece ocorrer em uma forma polimérica instável, em que carboidratos desempenham um papel estrutural na formação destes agregados. Do mesmo modo, MORR e SEO (1988) e SHARMA *et al.* (1993) expuseram que é aparente a massa molecular do CMP, com valor teoricamente esperado de 8 kDa. Eles atribuíram isso a natureza volumosa da porção de hidrato de carbono associado com o CMP ou a interações peptídeo-peptídeo. KAWAKAMI *et al.* (1992) relataram uma associação dependente do pH / dissociação do CMP. A pH 7,0 a massa molecular aparente variou de 20 a 50 kDa mas a pH 3,5 variou de 10 a 30 kDa. Eles sugeriram que tanto o CMP forma associações a pH neutro por meio de interações não covalentes, ou então, a hidratação do CMP ocorre neste pH. Considerando que a massa molecular máxima da forma glicosilada de gCMP é 11kDa e a aCMP é 7 kDa (forma monomérica), o CMP pode se apresentar consistindo de diferentes formas associadas hidrofobicamente, tetramérica aCMP ou dimérica gCMP, provavelmente formado durante o fabrico de queijo ou de transformação da CMP, no entanto, com massa molecular de 23 a 28 kDa com pH 6,5 original. (FARIAS *et al.*, 2010). Além do que, em trabalhos anteriores, tem sido demonstrada a existência de interações associativas entre CMP e beta lactoglobulina na fase aquosa a pH neutro.

É bem conhecido que, durante o aquecimento do leite, b-lactoglobulina pode formar um complexo com kapa-caseína micelar na superfície, o que limita a hidrólise de kapa-caseína pelo coalho e liberação de CMP (CALVO *et al.*, 1995).

O perfil do cromatograma do CMP é mostrado na FIGURA 03. Os picos 2 e 3 são formas não-glicosiladas da variante A e B, porém são predominantemente monofosforiladas com presença de pequena soma de formas di e tri fosforiladas. O pico 1 representa a mistura complexa de formas mono, di e oligoglicosiladas das variantes A e B (THOMA-WORRINGER, LÓPEZ-FANDINÓ, 2006). Neste cromatograma, a eluição das proteínas foi detectada a 210 nm, com amostras com concentração de 5mg/mL e volume de injeção de 50 µL. O tempo de retenção do padrão de CMP e a contagem de área total dos picos (PAC) de CMP estão entre 4 e 8 min.

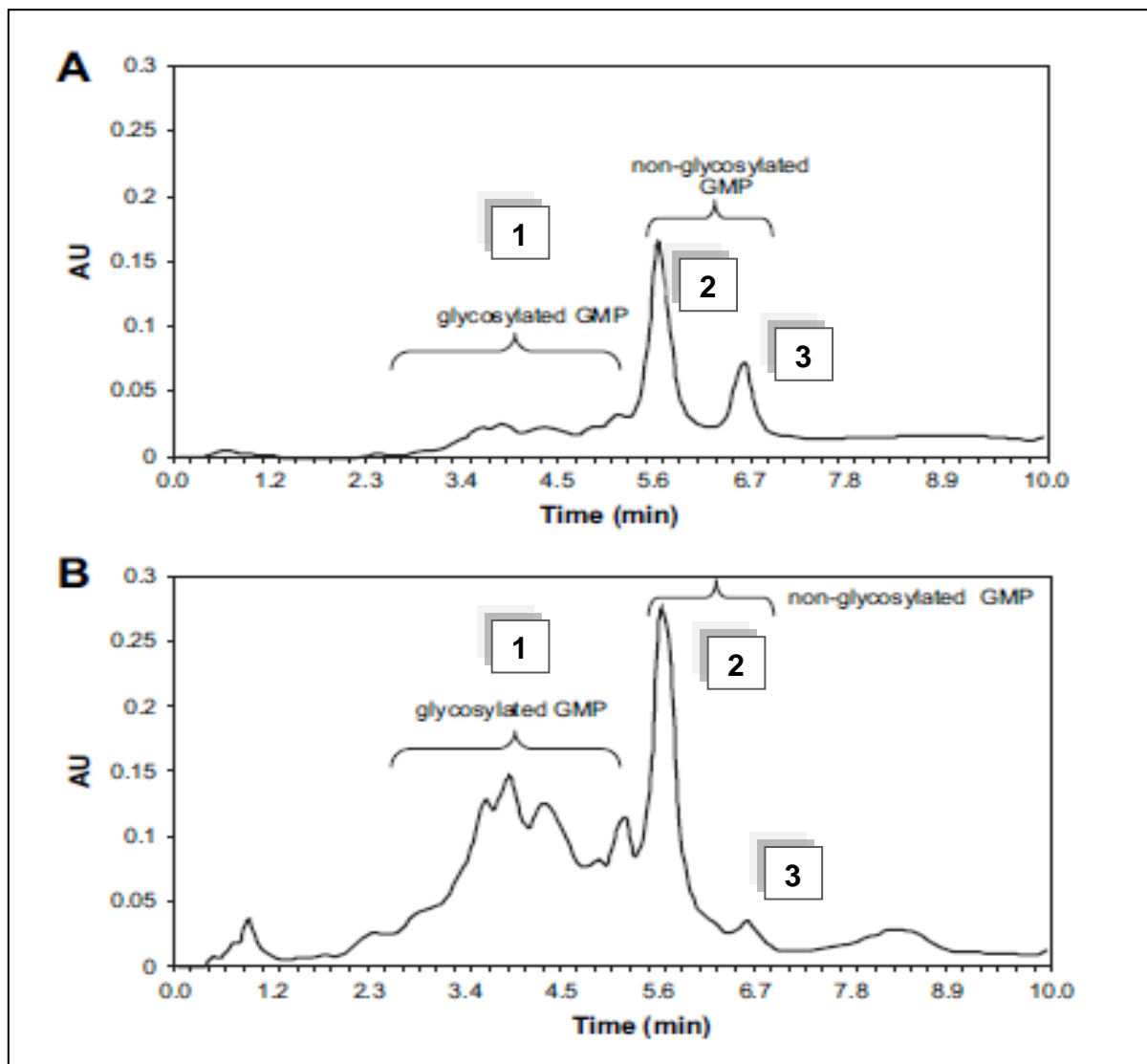


FIGURA 03 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO CMP

FONTE: TAYLOR, WOONTON, 2009.

NOTA: precipitado de CMP (A) e fração solúvel de CMP (B) de amostras isoladas de coagulados de leite tratados termicamente (65 °C por 15 seg.). (1) forma glicosilada, (2) forma não-glicosilada da variante genética A, (3) forma não-glicosilada da variante genética B.

TAYLOR *et al.* (2009) em seu experimento para isolar CMP do leite, submeteram em seguida a diálise para remover o sal. Houve um precipitado presente no interior do tubo de diálise, fracionando o isolado de CMP em solúvel e insolúvel. A amostra de precipitados de CMP (FIGURA 03A) exibiu dois picos proeminentes aos 5,75 e 6,75 min., as quais são formas não-glicosiladas da variante genética A e B do CMP respectivamente. A amostra solúvel de CMP teve um destacado grupo de co-eluição formado por picos entre 2 min. e 5,5 min. (FIGURA 03B) que correspondem a formas glicosiladas de CMP. Além disso, também

apresenta um pico proeminente a 5,75 min., que retrata a aCMP da variante A. Ou seja, as formas não-glicosilada de CMP tendem a precipitar (insolúvel) e as formas glicosiladas tendem a permanecer solúveis quando pequenas espécies iônicas são removidos da solução por diálise. A aCMP da variante A é comum a todo o precipitado e às amostras de CMP solúvel. Esta se torna parcialmente insolúvel durante a diálise e fraciona quase igualmente no precipitado e na fração solúvel (TAYLOR, WOONTON, 2009).

A variante A do CMP contém treonina na posição 136 e ácido aspártico na posição 148 da sequência de aminoácidos (BRODY, 2000; SWAISGOOD, 1982). Ambos estes aminoácidos são hidrofílicos. A variante B, no entanto, contém isoleucina na posição 136 e alanina na posição 148 (SWAISGOOD, 1982), ambos os quais são considerados hidrofóbicos. Explica-se, assim, que a precipitação completa do pico a 6,75 min (CMP variante B) é muito provavelmente devido à presença dos aminoácidos hidrofóbicos isoleucina e alanina.

Há vários relatos sobre fracionamento de glicoformas de CMP utilizando ácido tricloroacético (TCA). VASBINDER, ROLLEMA e KRUIF (2003) descobriram que era possível precipitar a maioria das formas não-glicosiladas de CMP com 12% TCA. Além disso, LI e MINE (2004b) e THOMA *et al.* (2006) relataram a precipitação e isolamento de fração não-glicosilada e glicosilada de CMP, utilizando TCA.

Quase todo o conteúdo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) presente na caseína está presente no CMP; conseqüentemente, a medida do teor desse ácido possibilita a detecção de soro de queijo no leite, o qual é adicionado com intenção de fraude (DRACZ, 1996). Além de que, esta determinação do ácido siálico no filtrado TCA, também, pode ser adotada como uma medida do CMP.

2.2.4.1 Atividade Biológica do CMP

O interesse na purificação do CMP é devido ao seu elevado valor nutricional e funcional vinculado a um grande potencial de aplicação. Entre uma das boas aplicações do CMP, está a finalidade de reduzir a incidência de cáries dentárias. MALKOSKI *et al.* (2001) demonstraram que o CMP inibiu o crescimento dos

patógenos orais *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*, responsáveis pelo desenvolvimento de cáries.

Um número crescente de estudos mostra que o CMP pode exercer importantes atividades biológicas e fisiológicas. Possui capacidade de reduzir a toxina da cólera e as enterotoxinas da *Escherichia coli*, inibe a adesão bacteriana e viral nas células epiteliais intestinais. Ou seja, no âmbito geral, o CMP modula a resposta imune. O CMP tem efeito sobre a promoção do crescimento das bifidobactérias, sobre o suprimento da secreção gástrica e modificação do crescimento da bactéria do ácido láctico e também possui efeito sobre a circulação de sangue (ABD EL-SALAM *et al.*, 1996; THOMA-WORRINGER *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009). Pesquisas de sua habilidade para nutrir a microflora intestinal saudável apontam-no com um ótimo potencial para o uso como prebiótico em alimentos (IDOTA *et al.*, 1994). Alguns estudos demonstram que o CMP reduz o apetite, fazendo dele um componente apropriado em produtos utilizados no controle de peso (YVON *et al.*, 1994). TAKAHASHI *et al.* (1992) relataram a obtenção de um alimento hipoalergênico à base de CMP, com elevado valor nutritivo, facilmente absorvido e digerido e com ação anti-inflamatória.

As atividades biológicas são atribuídas principalmente a cadeias de carboidratos. O CMP tem um caráter anfifílico, o que resulta da glicosilação parcial. Os resíduos de açúcar são altamente hidrofílicos, considerando que a cadeia de peptídeo é mais hidrofóbica (TOLKACH; KULOZIK, 2005). As formas glicosiladas da CMP (gCMP) representam diferentes sítios de glicosilação, bem como cadeias de oligossacarídeos, feitos de uma ou mais unidades de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), galactose e resíduos de N-acetilgalactosamina, os quais foram identificados em CMP (DAALI *et al.*, 2001). O carboidrato de maior predominância é o ácido siálico (COOLBEAR *et al.*, 1996). O ácido siálico é importante para a atividade biológica e farmacológica de glicoproteínas e em alguns casos, sua perda causa a atividade reduzida (DAALI *et al.*, 2001). É um açúcar ácido com o valor de pKa igual a 2,2. A maior concentração de ácido siálico no CMP confere pl menor para este glicopeptídeo. A precisão do pl do CMP depende da natureza e do conteúdo de ácido siálico anexado na cadeia de carboidratos e/ou sobre o grau de fosforilação (CHERKAoui *et al.*, 1997; SILVA; NAKANO; OZIMEK, 2002; LIESKE *et al.*, 2004). O pl do CMP está próximo de 4,1, que está relacionado com a grande quantidade de ácidos nas cadeias laterais de aminoácidos (KREUB *et al.*, 2009). A

carga positiva do CMP em pH inferior ao pI , é proveniente dos três resíduos de Lys, dos N-terminal carregados positivamente e de todos os resíduos Glu e Asp, os quais são protonados. O pI do gCMP, em contraste, está em 3,15, porque a carga negativa dos resíduos de ácido siálico diminui a carga total de toda a cadeia da proteína (KREUB *et al.*, 2009).

Entre os pesquisadores há um consenso geral de que o CMP se comporta como um peptídeo muito maior do que sua massa teórica. Alguns estudos relatam que esta agregação aparente do CMP, assim como a desagregação, depende do pH. Em contra partida, em outros estudos não foi observado que a massa do CMP dependia da mudança do pH (KAWASAKI *et al.*, 1993; LIESKE *et al.*, 2004; MIKKELSEN *et al.*, 2005; NAKANO; OZIMEK, 1998).

Algumas das propriedades inerentes deste peptídeo foram descritas por SMITHERS *et al.* (1991) e MARSHALL (1991), os quais estudaram as propriedades funcionais de formação de espuma e gel em soluções aquosas de CMP como também os efeitos da incorporação destes em inúmeros alimentos, incluindo merengues, biscoitos e geléias de frutas. MARSHALL (1991) pesquisou com mais detalhes as propriedades de espumabilidade e estabilidade de espuma, além de encontrar uma forma de fortificar geléias de frutas com CMP, obtendo dessa forma uma fonte de proteína de baixo teor de fenilalanina e assim, destinadas aos indivíduos fenilcetonúricos.

2.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO DE ISOLADO PROTÉICO DO SORO DO LEITE (WPI) E DO CASEINOMACROPEPTÍDEO (CMP)

2.3.1 Concentrados e Isolados Protéicos de Soro de Leite

O produto industrializado proteína do soro de leite, é obtido por precipitação isoelétrica, cromatografia de troca iônica, microfiltração e ultrafiltração. O concentrado (WPC) ou o isolado (WPI) protéico do soro do leite contém altos teores de proteínas nativas, que podem ser obtidas por essas tecnologias, garantindo um amplo potencial de funcionalidades (SCHMITT *et al.*, 2011).

Uma série de produtos de proteína de soro de leite são fabricados a partir de diferentes tipos de soro de leite, diferenciando nas concentrações de proteínas, minerais, lipídios e lactose. Além disso, as proteínas do soro são sensíveis a tratamentos térmicos e sofrem desnaturação e agregação após aquecimento superior a 70°C. As variações em graus de desnaturação de proteínas e de agregação também resultam em diferentes propriedades físico-químicas e propriedades funcionais do produto final (DE WIT; KLARENBECK; ADAMSE, 1996). O fabrico de WPCs envolve a ultrafiltração (UF) do soro de leite para concentrar proteínas e diafiltração (DF) para remover efetivamente a maioria dos minerais, lactose e outros componentes de baixo peso molecular. O retentado geralmente é concentrado por evaporação antes da secagem, a fim de minimizar o custo de remoção de água e melhorar as propriedades físicas do pó (HOBMAN, 1992).

2.3.2 Métodos de Separação do CMP

Diferentes métodos de separação de CMP são descritos na literatura, sendo que a maior parte foi desenvolvida em escala de laboratório ou se encontra protegida por patentes. Atualmente, dois métodos de separação de CMP do soro de queijo têm sido empregados, sendo que ambos utilizam a ultrafiltração.

Segundo a tendência, a utilização de soro de leite coalhado, como um material de partida, se aprovada a viabilidade, pode ser economicamente importante para o aumento da utilização de soro de leite. TANIMOTO *et al.* (1990) descreveram um método para a produção CMP baseado na massa molecular de CMP dependente do pH. O pH do soro de leite foi ajustado a < 4 , onde CMP se apresenta, em grande parte, na sua forma monomérica (7 kDa), e então ultrafiltrado. O permeado continha o CMP enquanto outras proteínas do soro de leite foram mantidas no retentado. O permeado foi então ajustado para pH 7,0 onde CMP forma agregados de peso molecular > 32.000 Da. A solução foi então ultrafiltrada novamente para concentrar o CMP.

O método descrito por KAWASAKI *et al.* (1996) é baseado na habilidade do CMP em estabelecer interações moleculares formando assim polímeros com massa molecular maiores do que 50 kDa em pH 7,0, com posterior dissociação em

condições ácidas. A forma dissociada do CMP permeia através de uma membrana de 20 kDa a 50 kDa em pH 3,5, enquanto a maioria das proteínas do soro são retidas nessa membrana. Depois o pH é ajustado para 7,0 e o permeado contendo o CMP pode ser concentrado por meio da mesma membrana. Esta técnica garante uma boa separação do CMP de outras proteínas nativas do soro, mas devido à baixa taxa de permeabilidade do CMP, pelo menos duas etapas de diafiltração são necessárias para obter uma fração com alto grau de pureza e rendimento.

O método descrito por MARTÍN-DIANA e FONTECHA (2002) utiliza da alta estabilidade térmica do CMP frente às demais proteínas do soro. É feito um tratamento térmico no soro do leite com temperatura de 90°C por 1 hora, deixando as demais proteínas do soro desnaturadas por completo e agregadas. Essas proteínas desnaturadas são removidas por centrifugação a 5200 g a temperatura de 4°C por 15 minutos e, assim, o sobrenadante contendo o CMP pode ser concentrado por ultrafiltração com uma membrana MWCO 10 kDa depois de ajustado o pH para 7,0. Este método garante um bom rendimento, mas as proteínas do soro perdem a sua funcionalidade devido à desnaturação.

O CMP tem ponto isoelétrico (pI) abaixo de 3,8 (ETZEL, 2004), ao passo que outras proteínas do soro possuem pI acima de 4,3 (WALSTRA *et al.*, 2006). Esta diferença físico-química entre CMP e outras proteínas do soro é comumente utilizada em processos de isolamento para separar CMP do soro (THOMAS-WORRINGER *et al.*, 2006). O CMP disponível comercialmente isolado por cromatografia de troca iônica não é puro o suficiente para os alimentos destinados a pessoas com fenilcetonúria (PKU), porque possui fenilalanina (Phe) residual das proteínas do soro (cerca de 5 mg Phe/g do produto, de acordo com informações do fabricante, Davisco Foods Intl., Eden Prairie, Minnesota, U.S.A., 2012).

Os métodos propostos para a quantificação do CMP usam geralmente a cromatografia de fase reversa, a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de exclusão molecular, além da eletroforese capilar (MOLLE e LEONIL, 2005; MIRALLES *et al.*, 2001; ABD EL-SALAM *et al.*, 1996; DZIUBA e MINKIEWICZ, 1996).

2.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS PROTEÍNAS

As propriedades funcionais das proteínas classificam-se em três principais grupos: propriedades de hidratação, as quais são dependentes da interação proteína-água (absorção, retenção, molhabilidade, adesão, dispersibilidade, solubilidade e viscosidade); propriedades que estão relacionadas às interações proteína-proteína (precipitação e geleificação) e propriedade de superfície (tensão superficial, emulsificação e formação de espuma) (MESSENS *et al.*, 1997).

2.4.1 Sistemas Coloidais: Gel

As substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação (CAMPOS *et al.*, 1999). Assim, pode-se definir o gel como uma preparação semi-sólida composta de partículas coloidais que não precipitam (ficam dispersas).

Os polímeros são basicamente substâncias de alto peso molecular, que também são chamadas de macromoléculas. Estas substâncias são provenientes do encadeamento de moléculas menores (MARTIN, 1993).

De acordo com as características dos polímeros, os géis podem apresentar natureza iônica ou não-iônica. Os géis de natureza não-iônica possuem estabilidade em ampla faixa de pH. Os de caráter aniônico são pH dependentes, ou seja apresentam-se estáveis em pH neutro ou próximo do neutro (MAIA CAMPOS *et al.*, 1999).

2.4.2. Gel de Isolado Protéico de Soro de Leite (WPI)

Concentrados (WPC) e isolados (WPI) protéicos do soro do leite são amplamente utilizados como ingredientes alimentares devido às suas propriedades de geleificação, pois permitem o controle da textura e estabilidade dos produtos alimentícios. Desempenham papel fundamental em determinados alimentos e em outras propriedades funcionais, como absorção de água, formação e estabilização de espumas e emulsões. Para que se forme o gel protéico é necessário que haja desnaturação e agregação posterior de forma ordenada, em que predominem as interações proteína-proteína (ORDÓÑEZ, 2005).

A capacidade das proteínas do soro de formar gel tem sido geralmente atribuída a beta-lactoglobulina que é a principal proteína do soro de leite bovino. No entanto, o soro compreende outras proteínas que podem formar gel e, portanto, interagir com a b-Ig. Foram feitos vários estudos sobre a geleificação térmica de misturas de beta-lactoglobulina, lactoalbumina ou soroalbumina bovina, no entanto, com o CMP são escassos. WANG (2007), relatou que o CMP foi também capaz de formar um gel em pH < 4,0. Em outro trabalho, THOMA-WORRINGER *et al.* (2006) estudaram o impacto das interações entre o CMP e WPI sobre as propriedades de espuma, o que sugere o uso desta combinação. MARTINEZ *et al.* (2009), mostraram que o CMP apresentou maior atividade superficial do que a β -lactoglobulina em sistemas mistos com este. O último dominou a pressão da superfície estática e dinâmica, além das propriedades reológicas de filmes interfaciais. Esse comportamento foi atribuído à ligação do CMP a b-Ig na fase aquosa, que impede a adsorção do CMP, se este estivesse sozinho. Quanto ao impacto do CMP sobre a geleificação induzida pelo calor, de proteínas de soro, VEITH e REYNOLDS (2004) demonstraram que em pH 7,0 a presença de CMP na WPC foi prejudicial à força do gel e à capacidade de retenção de água.

Dependendo do pH, da força iônica e da concentração de proteína, a b-Ig é capaz de formar, após aquecimento: fibrilas (pH 2,0), partículas (no pI) ou agregados fractal (pH > 6,0) (BROMLEY *et al.*, 2005, 2006; GOSAL *et al.*, 2002; MEHALEBI *et al.*, 2008). Nas condições de pH levemente ácido (pH 5,7 e 5,9) e muito baixa força iônica, ficou em formato esférico, monodispersa individualizada na forma de

microgéis (DONATO *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2008). Esses agregados de proteínas são definidos como microgéis, por apresentarem a característica de serem macromoléculas, intramolecular e reticuladas, no qual constituem uma nova forma de molécula de polímero (GRAHAM; CAMERON, 1998). Mostram-se também, em forma esférica, em interface definida com grande superfície potencial, com diâmetro variando de 100 a 600 nm e índice de polidispersão inferior a 0,2. Os microgéis são resultados de uma agregação auto-limitada, controlada pela carga de proteína e as regiões hidrofóbicas expostas devido à desnaturação térmica (SCHMITT *et al.*, 2009). Outro estudo relatou a formação de dispersões de micropartículas sobre o aquecimento de um isolado protéico de soro com pH de 5,7 a 6,3 com concentração de 6% de proteína em peso (BRITTEN, 1998). Microgéis de proteínas do soro do leite também foram obtidos após aquecimento de isolado protéico de soro de leite, a 1% em massa, em pH igual a 6,0 e temperatura abaixo de 85°C (SCHMITT *et al.*, 2007).

SCHMITT *et al.* (2011) investigaram o efeito da proteína e da composição mineral sobre a formação de microgéis de proteínas do soro em concentração de 4% em peso. Inicialmente, foi feita a mistura da α -lactalbumina (α -la) e a beta-lactoglobulina (b-lg) nas razões de 20/80, 50/50 e 80/20, em seguida foi aquecida a 85°C por 15 minutos entre pH 5,7 e 6,2. A dispersão pura de α -lactalbumina não formou microgéis, mas sim precipitados (12 %) e agregados solúveis (83 %). Após a mistura com b-lg, microgéis só foram obtidos para o índice de 20/80 em pH 5,7 ou por b-lg pura em pH 5,8. Interessantemente, essa proporção era próxima à composição natural que ocorre na maioria dos isolados de proteína do soro comercial (WPI) e as partículas eram mais ou menos agregadas e não esféricas. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que a lactalbumina reduziu as forças de atração hidrofóbicas envolvidas na formação de microgel, deslocando o equilíbrio no sentido da via de agregados solúveis. A conversão das proteínas nativas em microgéis foi cerca de 51% para a mistura modelo 20/80 de α -la/ β -lg. Sendo que para WPI essa conversão foi maior, cerca de 70 e 85%. Para testar o efeito da composição mineral, o WPI comercial foi desmineralizado e sua capacidade de formar microgéis foi testada novamente. Feito isso, o comportamento do WPI foi semelhante ao sistema modelo 20/80 α -la/b-lg, no entanto o rendimento de conversão em microgéis caiu para cerca de 65 % em pH 5,7. Por conseguinte, concluíram que, além de controlar a relação de mistura, também é necessário o

controle das interações hidrofóbicas entre as proteínas desnaturadas, que foi responsável por cerca de 50% do rendimento de conversão em microgel, e a composição mineral inicial de WPI contribuiu para outros 20-35% de rendimento, modulando as forças repulsivas entre as proteínas desnaturadas, promovendo a agregação.

2.4.3 Gel de CMP

As propriedades de geleificação de CMP foram descritos por BURTON e SKUDDER (1987) que descobriram que uma solução contendo 9,3 % CMP formou um gel a pH 4,5 a 20 °C, mas não quando aquecida a 90 °C. No entanto, MARSHALL (1991) não reproduziu esses resultados, enquanto AHMED e RAMASWAMY (2003) verificaram que 12,5 % de solução de CMP gelificou em 80 °C e pH 7,0. Em comparação com concentrados de proteína de soro de leite, revelaram que a presença de CMP foi prejudicial à força de gel e à retenção de água. O CMP não se incorpora à rede de gel de proteína e, assim, concorre com outras proteínas para se ligar a água (VEITH; REYNOLDS, 2004).

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é cada vez mais utilizado para determinar o tamanho molecular, o raio hidrodinâmico e a cinética de totalização dos biopolímeros. As proteínas, devido às características especiais de sua estrutura molecular (um grande número de ambos grupos funcionais, os polares e não-polares em suas moléculas), são propensas a pronunciada auto-montagem em um meio aquoso, como resultado de formação da ligação física fraca, de caráter variável marcada pelas condições ambientais, como a acidificação, adição de íons divalentes ou ingredientes de baixa massa molecular, temperatura ou pressão alta, tratamento de fermentação (SEMENOVA, 2007).

FARIAS, MARTINEZ e PILOSOFF (2010) estudaram a cinética da automontagem, pH dependente, do CMP em DLS e sua geleificação espontânea a frio. Os resultados mostraram que, em relação à hidrodinâmica, o tamanho das partículas (diâmetro) aumentou quando o pH diminuiu de 6,5 até 3. Diferentes automontados formam estruturas ao longo do tempo em pH inferior a 4,5 e em determinadas concentrações de CMP formaram-se géis. As estruturas de

automontagem são parcialmente reversíveis ao pH, sendo que, uma vez formada, os dímeros parecem ser resistentes a mudanças de pH. A automontagem do CMP inclui um primeiro estágio de automontagens hidrofóbicas para formar dímeros que em seguida interagem eletrostaticamente a fim de formar gel ao longo do tempo. É visto que a segunda fase da automontagem que leva a geleificação só é possível na presença de cadeias laterais glicanas, principalmente ácido siálico, o que mantém cargas negativas até pH 2,2. É relatado, também, que a temperatura aumenta o potencial para interações hidrofóbicas (BRYANT; MC CLEMENTS, 1998).

MARTINEZ *et al.* (2010) estudaram o efeito de aquecimento na automontagem dirigida pelo pH no CMP e seu impacto sobre a dinâmica de geleificação. A concentração do CMP foi de 3% v/v para medidas feitas por DLS (espalhamento de luz dinâmica) e 12% v/v para medidas reológicas. As soluções com pH 4,5 e 6,5 não apresentaram qualquer alteração nas distribuições de tamanho de partícula com o aquecimento, em contraste com as soluções com pH inferior a 4,5, que mostrou que a auto-montagem eletrostática foi afetada pelo aquecimento. O diâmetro médio dos CMP montados aumentou com a diminuição do pH. Para todas as soluções com pH inferior a 4,5, o tamanho das partículas montados de CMP, formada durante o aquecimento, se mantiveram estáveis. A taxa de automontagem determinada por DLS, bem como a taxa de geleificação, aumentaram com o aumento da temperatura e diminuição do pH 4 para pH 2. O aumento da temperatura e a diminuição do pH, na primeira etapa de automontagem por interações hidrofóbicas do CMP, aumentou a sua velocidade. Todas as estruturas auto-organizadas e os géis formados em diferentes temperaturas foram reversíveis com a variação de pH, mas não voltaram ao tamanho inicial (monômero), e sim a formas associadas, essencialmente a dímeros de CMP. Em um trabalho anterior a este, um modelo de auto-montagem para CMP à temperatura ambiente foi proposto, envolvendo uma primeira etapa de montagem hidrofóbica seguida por uma segunda etapa de interação eletrostática que ocorre em pH abaixo de 4,5.

Foram estudados a dinâmica da geleificação térmica da mistura de caseinomacropéptido e beta-lactoglobulina, assim como suas interações na fase aquosa, em relação a pH 3,5 e 7,0. No pH 7,0, enquanto o CMP não formou gel, todos os sistemas mistos geleificaram, e um forte sinergismo foi observado para relação 25/75 CMP/b-Ig. Em comparação, em pH 3,5, onde ambos os componentes geleificaram por conta própria, um forte antagonismo foi observado, principalmente

na relação CMP/b-Ig de 75/25. O comportamento dos géis mistos é atribuído à formação de estruturas de aglomerados de CMP/b-Ig conduzidos eletrostaticamente e moduladas pelo pH, que foram observados por espalhamento de luz dinâmico e medidas por calorimetria diferencial exploratória (DSC) (MARTINEZ, 2010).

2.5. DEFINIÇÃO DE REOLOGIA

Reologia é a ciência da deformação e do fluxo da matéria. Estuda a maneira que os materiais respondem às deformações ou tensões aplicadas através de medições de parâmetros. Um dos objetivos da reologia é estabelecer a relação entre as propriedades reológicas do material e sua composição molecular. Esta relação está diretamente ligada à qualidade de materiais, no conhecimento das leis do movimento molecular e das interações intermoleculares (MALKIN, 1994).

Em outras palavras, a reologia descreve as deformações de sólidos e a fluidez de líquidos (LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001).

A viscosidade pode ser definida como a medida da fricção interna de um fluido, ou seja, a resistência encontrada pelas moléculas em se moverem no interior de um líquido, devido ao movimento Browniano e às forças intermoleculares (GOULD, 1992). Atualmente compreende-se que esta resistência, chamada de fricção interna ou viscosidade é uma medida de resistência de um fluido ao fluxo. De tal modo, o líquido seria a substância que muda continuamente de forma (flui), independente da intensidade da tensão aplicada (BARNES *et al.*, 1999; FREITAS, 2003).

Esta fricção é aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada, assim à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessária mais energia para que ocorra o “cisalhamento” (BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, 1994; MOTT, 1996).

Isaac Newton propôs a lei básica da viscosimetria através da descrição do comportamento de fluxo de um líquido ideal (equação 1):

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1)$$

τ = tensão de cisalhamento em Pa

η = viscosidade dinâmica em $Pa.s$

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento em s^{-1}

A resistência de um líquido ao fluxo é igual à tensão aplicada a um fluido que é proporcional ao gradiente de velocidade entre as camadas líquidas (FREITAS, 2003).

O fluido Newtoniano é aquele cuja viscosidade é igual, independente da taxa de cisalhamento na qual é medido, numa dada temperatura (BRASEQ, 2007). Este líquido Ideal ou Newtoniano é pouco aplicado por ter, a maioria das soluções, comportamento não Newtoniano. Assim, a viscosidade não é apenas uma constante da relação tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento, mas sim é uma função da tensão e da taxa de cisalhamento (BARNES *et al.*, 1999; FREITAS, 2003).

Para adaptar os dados de viscosidade de fluidos não-Newtonianos são utilizados modelos matemáticos que descrevem seu comportamento de fluxo. Tais modelos, como: Ostwald, Herschel-Bulkley, Ellis, Bingham, relacionam a tensão de cisalhamento com a taxa de cisalhamento, admitindo que a viscosidade aparente seja estimada. O modelo matemático mais abrangente é o de Herschel Bulkley, o qual é chamado de Lei da Potência Generalizada (equação 2). Pode ser aplicado para diversos fluidos não-Newtonianos, tais como, o pseudoplástico, o dilatante e o plástico (STEFFE, 1996; BOLMSTEDT, 2000).

$$(\tau - \tau_o) = \eta (\dot{\gamma})^n \quad (2)$$

τ = tensão de cisalhamento em Pa

τ_o = limite de escoamento = ponto de ruptura em Pa

η = coeficiente de consistência = viscosidade em $Pa.s^n$

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento em s^{-1}

n = índice de comportamento de fluxo adimensional.

Em fluidos Newtonianos $n = 1$ e $\tau_o = 0$. No comportamento de Bingham $n = 1$ e $\tau_o > 0$. Em fluidos pseudoplásticos $0 < n < 1$ e para dilatantes $1 < n < \infty$ (BOLMSTEDT, 2000).

Os materiais não Newtonianos podem ser classificados em dois grupos: os independentes do tempo e dependentes do tempo.

Fluidos pseudoplásticos, com ou sem tensão de deformação inicial, é caracterizado quando a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento (BRASEQ, 2007). A pseudoplasticidade em baixas taxas de cisalhamento, devido ao movimento browniano das moléculas ou partículas aleatórias, apresenta um comportamento similar aos Newtonianos, chamado de primeiro platô newtoniano. A partir de certa taxa de cisalhamento, ocorre a diminuição abrupta da viscosidade. Isto se dá devido ao início da orientação molecular sobre o fluxo até que as moléculas apresentem um deslizamento entre si, gerando uma região de viscosidade constante referente ao segundo platô Newtoniano (FREITAS, 2003).

Em fluidos dilatantes, a viscosidade do fluido aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo referido como o inverso da pseudoplasticidade. Esse tipo de fluxo é encontrado somente em líquidos que contém uma alta proporção de partículas rígidas insolúveis em suspensão (BOURNE, 1982).

Fluidos plásticos comportam-se como sólido em condições estáticas ou de repouso e após aplicação de certa força começa a fluir. Esta força aplicada denomina-se tensão de deformação. Ou seja, o sistema apresenta em repouso forças de ligações intermoleculares que o impede de fluir, até que a força externa seja superior à força de rede onde se observa o ponto de ruptura. Após começar a fluir o comportamento pode ser Newtoniano, pseudoplástico ou dilatante (BRASEQ, 2007; FREITAS, 2003).

No comportamento plástico de Bingham, o material apresenta forças internas que o impedem de fluir, até atingir a tensão de deformação inicial e em seguida começar a fluir apresentando um comportamento newtoniano (BRASEQ, 2007).

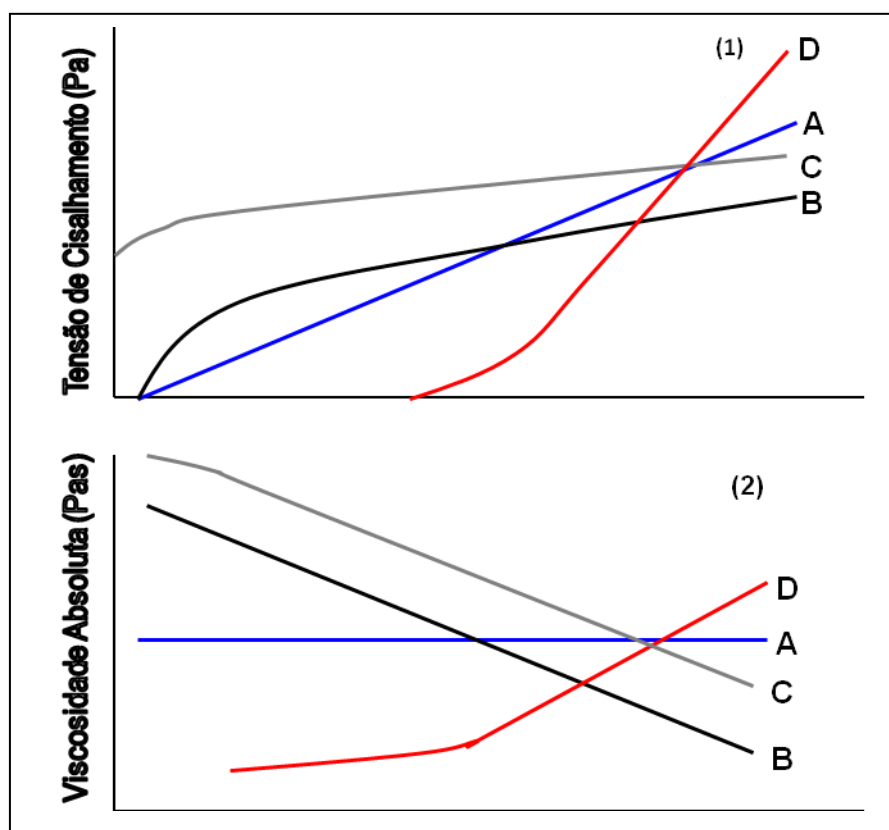


FIGURA 04 – CURVA DE FLUXO (1) E PERFIL DE VISCOSIDADE (2) DE FLUIDOS COM COMPORTAMENTO NEWTONIANO E NÃO NEWTONIANO

FONTE: adaptado de NAÉ, 1993.

NOTA: (A) Fluido Newtoniano; (B) Pseudoplástico; (C) Plástico e (D) Dilatante.

A variável tempo sob certo cisalhamento constante pode ser fator de alteração da viscosidade (BOLMSTEDT, 2000). Ou seja, alguns fluidos apresentam mudança na viscosidade em função do tempo sob condições constantes de taxa de cisalhamento (BRASEQ, 2007). É chamado tixotrópico quando a viscosidade diminui e reopético quando esta aumenta com o tempo (BOLMSTEDT, 2000).

2.5.1 Propriedades de Viscoelasticidade

Um material possui características de sólido elástico e de líquido viscoso, ou seja, é considerado viscoelástico, em que a reologia estuda sua deformação e recuperação. Tal amostra viscoelástica apresenta inicialmente comportamento sólido e posteriormente líquido.

Robert Hooke desenvolveu a base da teoria da elasticidade clássica, propondo que para um sólido perfeitamente elástico, a tensão e deformação são diretamente proporcionais (BARNES *et al.*, 1999; FREITAS, 2003). Um sólido ideal ou sólido de Hooke, submetido a uma tensão constante (força), sofrerá distensões em todas as direções e a quantidade de distensão é controlada pela quantidade de tensão. A distensão é mantida até que a tensão seja removida, a qual terá uma completa e instantânea recuperação (BRASEQ, 2007). Ou seja, um sólido não sofre modificações contínuas na sua forma para uma mesma tensão aplicada. Apresenta uma deformação máxima, quando a tensão for máxima, de tal forma que a tensão e deformação estão em fase (diferença de 0° de ângulo entre tensão e deformação) (REES, 1969; BARNES *et al.*, 1999; FREITAS, 2003).

O contrário a esse comportamento, um líquido ao ser submetido a uma tensão, deforma iniciando imediatamente o fluxo, não recuperando a forma inicial. Um fluido ideal, Newtoniano, que não apresenta característica elástica inerente ou estrutura de gel, nem possui alta viscosidade, ao ser submetido a uma tensão constante escoará enquanto a tensão for mantida (BRASEQ, 2007). Para um líquido Newtoniano a tensão não é proporcional à deformação (fora de fase 90°) e sim proporcional a velocidade de cisalhamento. Desta forma, tensão e deformação estão

fora de fase para um líquido perfeito, mas a tensão está em fase com a velocidade de cisalhamento (FREITAS, 2003).

O conceito de plasticidade era intrinsecamente relacionado ao corpo sólido, enquanto que viscosidade era sinônimo de estado líquido. No entanto, um material pode apresentar comportamento sólido ou líquido, dependendo da tensão aplicada. Assim, podemos substituir a classificação de sólidos e líquidos por uma distinção entre propriedades sólidas e líquidas. Sabe-se que a maioria das substâncias apresenta um comportamento intermediário entre as respostas de um sólido Hookeano e o comportamento líquido Newtoniano (FREITAS, 2003).

A FIGURA 05 mostra que quando uma tensão é aplicada em um corpo elástico ideal, 100% da energia é recuperada (A). Já quando uma tensão é aplicada a um fluido ideal, este deforma linearmente no decorrer do tempo e a deformação alcançada neste período será inteiramente mantida, conforme mostrado na FIGURA 05 (B). Um corpo real é viscoso e elástico. Isto significa que quando uma tensão é aplicada em um tempo t_0 a deformação se fará lentamente, quando a tensão σ é removida parte da energia armazenada no corpo será liberada. O resultado será a recuperação da deformação elástica γ_e e a deformação permanente viscosa γ_v como mostra a FIGURA 05 (C) (BRUMMER, 2006).

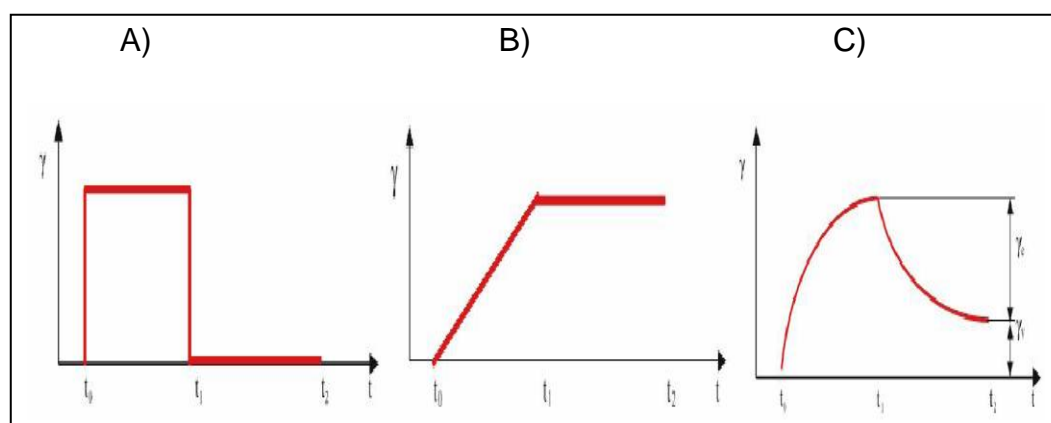


FIGURA 05 – GRÁFICO DE TENSÃO VERSOS TEMPO

NOTA: (A) Corpo elástico, (B) Corpo viscoso, (C) Corpo viscoelástico.

As dispersões de polímeros, os sistemas multifásicos, materiais com tecidos estruturais e semi-sólidos tais como pastas e géis são viscoelásticos por

apresentarem comportamento híbrido elástico e viscoso. Ao aplicar uma tensão em um material viscoelástico, o seu componente sólido elástico distende instantaneamente na proporção da magnitude da tensão aplicada. A extensão da distensão é chamada de deformação angular ou distensão em razão da tensão aplicada. Impondo uma tensão constante, a amostra sofre distensão crescente (semelhante ao estiramento elástico). Na fase inicial, a amostra pode continuar a distender primeiramente em alta velocidade, mas vagarosamente ao longo do tempo. Este período de tempo constitui a combinação entre a distensão elástica e deformação viscosa. Uma vez que os componentes com estrutura elástica da amostra alcançaram a sua distensão de estiramento máximo, toda a subsequente deformação é na verdade viscosa e, portanto não recuperável, da mesma forma que ocorre no fluxo.

Uma rede de gel viscoelástica pode ser avaliada por métodos reológicos, tais como: fluxo contínuo, tensão constante e oscilatória. Ou seja, a medida da viscoelasticidade pode ser feita por métodos estáticos e dinâmicos, porém somente através de ensaios oscilatórios (dinâmicos), as propriedades podem ser medidas simultaneamente (BRASEQ, 2007). Então, os níveis de organização de soluções, ou em redes intermoleculares, podem ser investigadas por estudos reológicos dinâmicos. Uma vez que análises viscosas em sistemas não oscilatórios apresentam limitada amplitude de aplicação (FREITAS, 2003).

Em testes dinâmicos oscilatórios, o material é submetido à variação de tensão ou deformação harmonicamente com o tempo. Os resultados são influenciados pela composição química e a estrutura física do material (STEFFE, 1996). A resposta dinâmica de materiais viscoelásticos pode ser usada para informação sobre o aspecto estrutural de um sistema a nível molecular ou prever o comportamento macroscópico, desde que o ensaio seja feito dentro do intervalo de viscoelasticidade linear.

Os líquidos viscoelásticos geralmente contêm uma rede de moléculas tridimensional que se deforma elasticamente devido às grandes moléculas. Na deformação oscilatória destes líquidos, somente parte da energia aplicada é recuperada, porque uma parte da rede tridimensional tende a escoar sob tensão. Redes mais resistentes à ruptura possuem maior componente elástico. Um material

viscoelástico responde como um sólido em intervalos de tempo curtos (alta frequência) e um líquido em intervalos de tempo longos (baixa frequência) (BRASEQ, 2007).

As análises oscilatórias permitem determinar a energia elástica armazenada e a energia perdida pelo fluxo viscoso. São determinados através do cálculo dos módulos elástico, viscoso, complexo e outros parâmetros, utilizados para estudo da viscoelasticidade de sistemas complexos (DOLZM; HERNANDEZ; DELEGIDO, 2008).

No teste de deformação aplica-se uma tensão baixa e constante sobre a amostra por um determinado período de tempo. A resposta da amostra à tensão aplicada, quanto à distância e velocidade com que se moveu em função do tempo é a propriedade de deformação do material. Quando a deformação é pequena, ou é aplicada de forma muito lenta, os arranjos moleculares estão próximos ao equilíbrio. Assim, esta resposta mecânica é apenas uma reflexão dos processos dinâmicos a nível molecular que mudam constantemente, os quais ocorrem mesmo quando o sistema está em equilíbrio. Este é o domínio da viscoelasticidade linear. As magnitudes de tensão e deformação estão linearmente relacionadas e o comportamento de qualquer líquido é completamente descrito como uma simples função do tempo (BRASEQ, 2007).

Se for medido o ângulo de fase entre tensão e deformação tem-se uma medida do grau do comportamento sólido ou líquido, quantificados através do módulo de cisalhamento dinâmico ou de estocagem G' e módulo de perda G'' (FREITAS, 2003).

O módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total a deformação do sistema, é definido como (equação 3):

$$G^* = \tau^o / \gamma^o \quad (3)$$

τ^o = tensão total

γ^o = deformação

Também pode ser subdividido em dois componentes (equação 4):

$$G^* = G' + G'' \quad (4)$$

G' = módulo de cisalhamento dinâmico ou de armazenamento

G'' = módulo de perda ou de viscosidade

O $G'(\omega)$ é o componente da tensão que está em fase com a deformação é chamado de módulo de armazenamento ou elástico, enquanto o $G''(\omega)$ é o componente da tensão que está 90° fora de fase com a deformação, chamado de módulo de perda ou viscoso. O G' representa a energia elástica armazenada, e o G'' representa a dissipação viscosa da energia. Os experimentos oscilatórios podem ser descritos através de números complexos onde o módulo complexo $|G^*|$ é composto por um par ordenado de números reais $|G^*| = [G', G'']$, onde G' é a parte real e G'' é a parte imaginária (FIGURA 06).

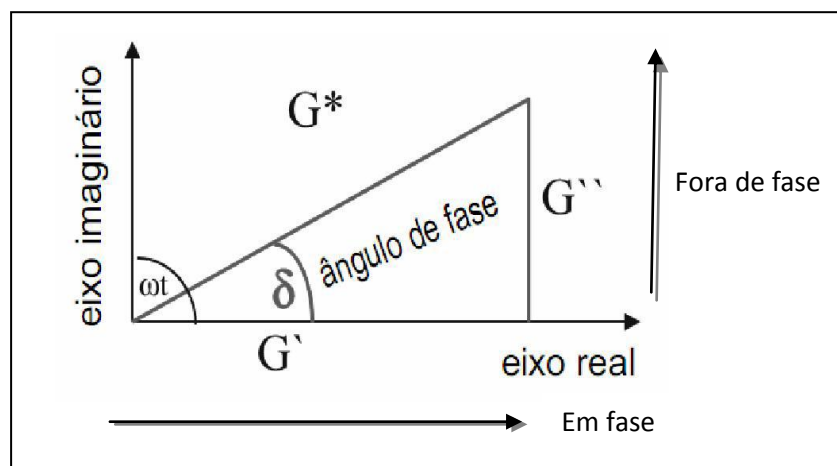


FIGURA 06 – MÓDULO COMPLEXO $|G^*|$

Então o ângulo de fase pode ser calculado matematicamente por (equação 5):

$$\tan \delta = G''/G' \quad (5)$$

A tangente de δ é uma forma de relacionar o teor de energia perdida e armazenada.

Para um sólido puramente elástico, o G'' é igual a zero, e o módulo de armazenamento (G') é igual ao módulo de cisalhamento complexo (G^*) (equação 7), o ângulo de fase é igual a zero, ou melhor, toda a energia aplicada ao sistema é armazenada a cada ciclo (NAÉ, 1993), conforme mostra a equação (6) abaixo:

$$G^* = G' \quad (6)$$

Já para um fluido Newtoniano, a viscosidade dinâmica complexa (η^*) é igual ao módulo de perda (G'') e ao módulo de cisalhamento complexo (G^*), o ângulo de fase é 90° , ou seja, toda energia aplicada ao sistema é dissipada na forma de calor (FREITAS, 2003).

$$G^* = G'' = \eta^* \quad (7)$$

Pode-se também obter o módulo complexo G^* (equação 8) e a viscosidade complexa $|\eta^*|$ (equação 9) (BRUMMER, 2006).

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (8)$$

$$|\eta^*| = G^*/\omega \quad (9)$$

As propriedades reológicas podem ser caracterizadas em dois tipos de sistemas: não oscilatórios (a viscosidade absoluta é uma relação entre a tensão e a taxa de cisalhamento) e oscilatórios (a viscosidade é dependente do módulo elástico e viscoso), denominada de viscosidade complexa (LAPASIN; PRICIL, 1995).

A faixa de tensão onde o módulo complexo G^* e o ângulo de fase δ são independentes da tensão aplicada é chamada de região viscoelástica linear. A mudança do ângulo de fase da região elástica ($\delta < 45^\circ$) para a região viscosa ($\delta > 45^\circ$) pode indicar a destruição da estrutura interna do sistema (LIPPACHER; MULLER; MADER, 2004; SCHRAMM, 2006). A varredura de tensão ou deformação, a uma frequência constante, é utilizada para determinar o limite da viscoelasticidade linear pela identificação do valor crítico deste parâmetro de varredura. Na região viscoelástica linear, não é observado dependência da deformação e da tensão em relação à frequência (LAPASIN; PRICIL, 1995). Um material mais estável apresenta uma região viscoelástica linear mais ampla do que um com uma estrutura fraca e sensível. Interações entre as partículas e a rede estrutural podem ser informadas através da varredura de frequência.

A maioria das emulsões possui uma rede estrutural interna resultante de forças intermoleculares interativas. Quando uma amostra estável é tencionada em uma faixa de frequência o módulo de armazenamento G' é maior que o módulo de perda G'' . Em gráfico, ambos módulos são aproximadamente paralelos ao eixo das abscissas em toda faixa de frequência medida, conforme mostrada na FIGURA 07A. Em amostras instáveis (FIGURA 07B), em baixas frequências o módulo elástico G' é igual ao módulo viscoso G'' ou $G' < G''$ devido à fraca estrutura interna, com o aumento da frequência ambos os módulos G' e G'' aumentam, onde o aumento de G' é mais rápido. Em altas frequências as unidades estruturais não podem mais movimentar-se e o material se comporta como um sólido viscoelástico onde $G' > G''$ (BRUMMER, 2006).

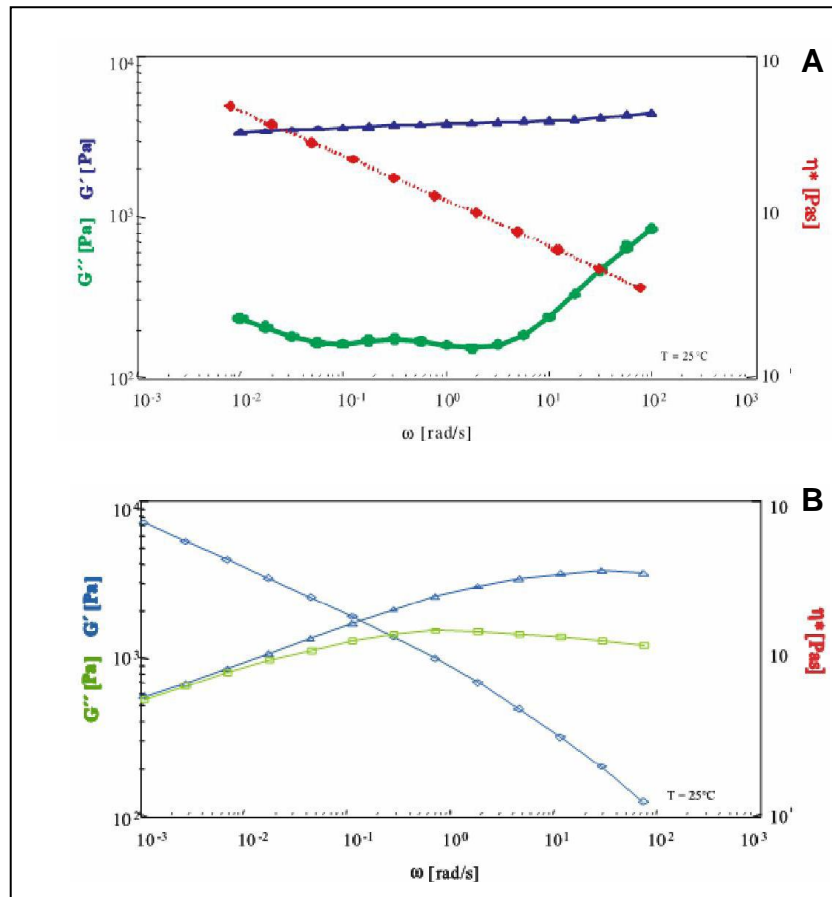


FIGURA 07 – DEPENDENCIA DA FREQUENCIA COM A FORÇA ESTRUTURAL
 FONTE: BRUMMER, 2006.

NOTA: (A) Alta força estrutural; (B) Baixa força estrutural.

Medidas reológicas têm sido amplamente utilizadas no estudo de interações sinérgicas em novas misturas de biopolímeros que possam ser úteis na indústria farmacêutica e de alimentos (NISHINARI; ZHANG; IKEDA, 2000).

FITZSIMONS, TOBIN e MORRIS (2008) caracterizaram a mistura sinérgica de glucomanana e xantana com medidas oscilatórias de baixa amplitude e análises de arraste e recuperação aplicando tensões entre 0,2 e 102,4 Pa. O efeito de sinergia foi observado pela redução da compliança da mistura sinérgica quando comparada aos valores das complianças das soluções contendo os polissacarídeos isolados. Observaram por espectro mecânico que este sistema apresenta caráter de gel onde $G' > G''$, também observaram o efeito da adição do sal cloreto de potássio e do modo de preparo, nas propriedades viscoelásticas do sistema.

2.5.2 Análise Oscilatórias

Nos testes oscilatórios, as amostras são submetidas a uma tensão τ aplicada que varia harmonicamente com o tempo de forma senoidal, produzindo uma deformação γ correspondente (FIGURA 08). A frequência f em herts (Hz) determina o período de oscilação, sendo esta relacionada a uma frequência angular ω expressa em rad/s (equação 10), onde

$$\omega = 2\pi f \quad (10)$$

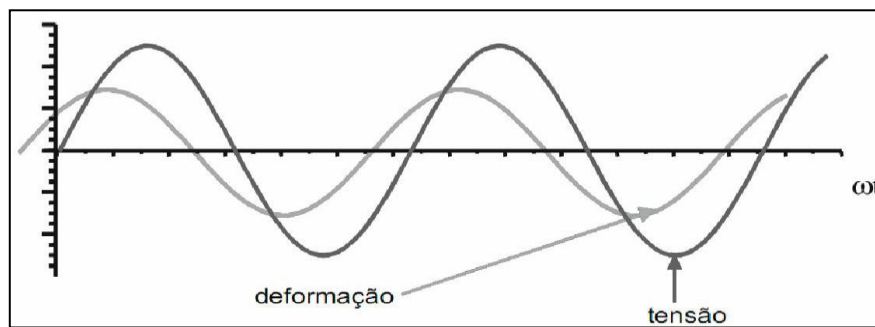


FIGURA 08 – CURVAS DE TENSÃO E DEFORMAÇÃO DE UM MATERIAL VISCOELÁSTICO
FONTE: BRUMMER (2006)

Os máximos e mínimos da curva senoidal formada pela variação de tensão não são necessariamente coincidentes com os máximos e mínimos da deformação. O ângulo δ pode ser definido como o valor que caracteriza a diferença de fase entre as oscilações da tensão e da deformação, e o período de tempo associado com o ângulo de fase é igual δ/ω . Em um fluido viscoso ideal a tensão e a deformação estão completamente fora de fase e $\delta = 90^\circ$. Em um sólido elástico perfeito a tensão e a deformação estão em fase e $\delta = 0^\circ$. Nos materiais viscoelásticos $0^\circ < \delta < 90^\circ$. Assim, quando $0^\circ < \delta < 45^\circ$ o material se comporta como um sólido viscoelástico e quando $45^\circ < \delta < 90^\circ$ é caracterizado um fluido viscoelástico (LARSON, 1999).

Na análise em sistemas viscoelásticos lineares, uma tensão oscilatória é aplicada à amostra e a sua resistência à deformação é medida, que se mostra independente da mesma. Nestes sistemas, pode-se observar uma independência do módulo de cisalhamento complexo (G^*), que representa a resistência total à deformação do sistema em análise, da tensão aplicada ou da deformação. Geralmente, são ideais deformações abaixo de 10% (FREITAS, 2003).

A FIGURA 09 mostra a representação gráfica de sistemas submetidos a medidas reológicas dinâmicas. A variação de G' , G'' e η^* em relação a frequência permite caracterizar o comportamento viscoelástico dos sistemas. A FIGURA 09A representa um perfil característico de um gel de polissacarídeo. O módulo G' é muito maior que o módulo G'' em toda a faixa de frequência, isto é, apresenta uma resposta predominantemente sólida, e ambos os módulos G' e G'' são essencialmente independentes da frequência, como esperado para uma rede elástica. Quanto maior o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; RAO, 1992). A viscosidade dinâmica complexa η^* diminui linearmente com aumento da frequência (MORRIS, 1995).

Soluções concentradas de polímeros apresentam comportamento de fluxo semelhante ao de um líquido em baixas frequências. Ocorre predomínio de G'' , devido à reorganização da rede enquanto a frequência é baixa (FIGURA 09B). Quando a frequência vai aumentando em relação à reorganização molecular, ocorre distorção da rede, com G' aumentando mais rapidamente que G'' . Deste modo, os módulos tornam-se praticamente iguais e se cruzam em determinado ponto, no qual é o ponto de geleificação. A partir do momento que G' é maior que G'' , há predomínio do caráter sólido (KAVANAGH; ROSS-MURPHY, 1998; MORRIS, 1984).

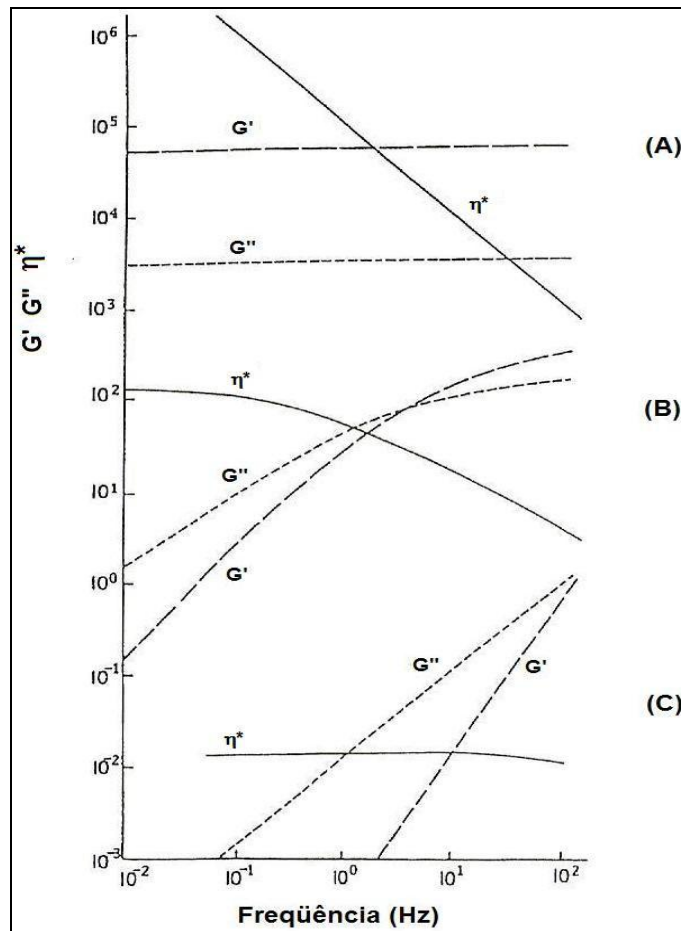


FIGURA 09 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE SISTEMAS
FONTE: MORRIS (1995).

NOTA: (A) Gel forte; (B) Solução concentrada; (C) Solução diluída.

O comportamento típico de uma solução polimérica diluída é demonstrado na FIGURA 09C, onde o módulo G' é significativamente mais baixo que o módulo G'' , e ambos tendem a zero quando a frequência tende a zero. Em baixas frequências predomina o movimento translacional, onde a energia é dissipada por entre o solvente. Em frequências mais altas, ocorre maior movimento de contorção das cadeias e armazenamento de energia, e G' aproxima-se de G'' . A viscosidade dinâmica complexa η^* apresenta um comportamento essencialmente linear com o aumento da frequência (MORRIS, 1984).

2.6 IMPORTÂNCIA DA REOLOGIA

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem, transporte, exposição e consumo do produto-final. Nessas etapas da cadeia produtiva, o alimento sofre contínuas variações de temperatura. O produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação respectiva, sendo necessário conhecer as velocidades de deformação nas operações a que vão estar sujeitas durante o processo. Além do que, é importante saber das propriedades reológicas dos produtos em função da temperatura (LEONARDI, MAIA CAMPOS, 2001; CÁNOVAS, 2002).

Os dados reológicos na indústria de alimentos são importantes para:

- realizar cálculos de engenharia de processos, englobando equipamentos como; agitadores, extrusoras, bombas, trocadores de calor, tubulações e homogeneizadores.
- determinar a funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos.
- controlar a qualidade do produto final ou em processo de fabricação.
- avaliar a textura pela correlação com dados sensoriais (MASKAN; GOGUS, 2000).

A viscosidade faz parte das propriedades reológicas dos alimentos, que envolve, além dos fluidos, os sólidos e semi-sólidos (MOTT, 1996). Os alimentos em geral, podem ser classificados em sólidos, gel, líquidos homogêneos, suspensões líquidas e emulsões (RAO, 1999). À medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessária mais energia para que ocorra o “cisalhamento”, que acontece sempre que o fluido é fisicamente movido ou distribuído, como no escoamento, espalhamento, aspersão, mistura entre outros. Fluidos muito viscosos exigem mais força para mover-se que materiais menos viscosos (BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES, 1994).

Nos estudos de reologia, como foi demonstrado, existem os sistemas Newtonianos e os não-Newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como é o caso de alimentos, apresentam fluxo não-Newtoniano, que é representado por três tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante (ANSEL, 2000).

Para as formulações de géis em alimentos, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses compostos têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, e, portanto sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (SCHOTT, 1995). Essa viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (LEONARDI e MAIA CAMPOS, 2001). Como a viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo, quanto maior a viscosidade, maior a resistência (ALMEIDA e BAHIA, 2003).

As soluções pseudoplásticas possuem comportamento resultante de uma estrutura em rede totalmente organizada formada por ligações hidrogênio e pelo emaranhamento do polímero, o que contribui para alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento. Com o aumento da taxa de cisalhamento, ocorre a desagregação dessa rede e o alinhamento das moléculas individuais de polímero na direção da força cisalhante (NUTRA SWEET KETCO, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA E REAGENTES

Como matéria-prima para extração do CMP foram utilizadas duas amostras de soro de leite em pó, fornecidas pela empresa SOORO em agosto de 2011 e fevereiro de 2012. O isolado protéico de soro (WPI) foi doado pela empresa Kraki & Kratschmer Ltda (Whey protein isolate – WPI: Arla Foods Ingredients Ltda).

Resina trocadora de ânion DEAE – Sephacel da marca Pharmacia Biotech.

Os padrões utilizados foram: padrão de ácido siálico com código 227040250 da Acros Organics e o padrão de CMP da marca Sigma de código C-7278-10mg.

Os demais reagentes utilizados, de grau analítico, foram das marcas: Merck, J.T. Baker, Pharmacia, Sigma, Carlo Erba.

3.2 EQUIPAMENTOS

Sistema de ultrafiltração com membranas de “cut-off” 50 kDa e 30kDa, com área 0,5 m². O material do filtro era de poliestersulfona, polipropileno e adesivo de poliuretano, na configuração cassete com número de catálogo P2B050A05 e P2B030A05 da empresa Millipore Ind. e Com. Ltda. Foi utilizada ainda, membrana de “cut-off” 5 kDa, com área 0,5 m², material filtro de celulose regenerada, polipropileno e adesivo de poliuretano na configuração cassete com número de catálogo P2C005C05 da empresa Millipore Ind. e Com. Ltda.

Cromatógrafo líquido Agilent 1200 series, acoplado com detector UV/Vis com coluna OmniSpher C18 (250mm x 4,6mm x 5 µm).

Liofilizador L101 da marca Liobrás Ind. Com. e Serv. Ltda.; espectrofotômetro UV/Vis; reômetro tipo Cone e Placa Rheostress RS 75 HAAKE, junto com o sistema

Peltier TC 81 HAAKE e banho termo circulante DC5 HAAKE; microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE.

Demais equipamentos de uso comum em laboratório, tais como: balança analítica; agitador magnético; banho termostático; estufa; mufla; centrífuga; cuba; banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner Unique); digestor (unidade DK20, Velp Scientifica); destilador automático (UDK140, Velp Scientifica); capela, entre outros.

3.3 METODOLOGIA

O delineamento experimental foi feito em quatro blocos que correspondem respectivamente ao isolamento, à caracterização, formação do gel de proteína, seu estudo reológico e estrutural.

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios dos Departamentos de Nutrição, Farmácia, Bioquímica, no laboratório de Biopolímeros do Departamento de Química e no laboratório de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

Na FIGURA 10 é apresentado o fluxograma da metodologia na íntegra.

A matéria-prima utilizada para o processamento foi o soro do leite em pó. A amostra de soro passou pelas etapas de ultrafiltração (1) ou cromatografia de troca iônica (2) para obtenção do CMP. A secagem do produto de ultrafiltração foi feita por *spray dryer* ou liofilização.

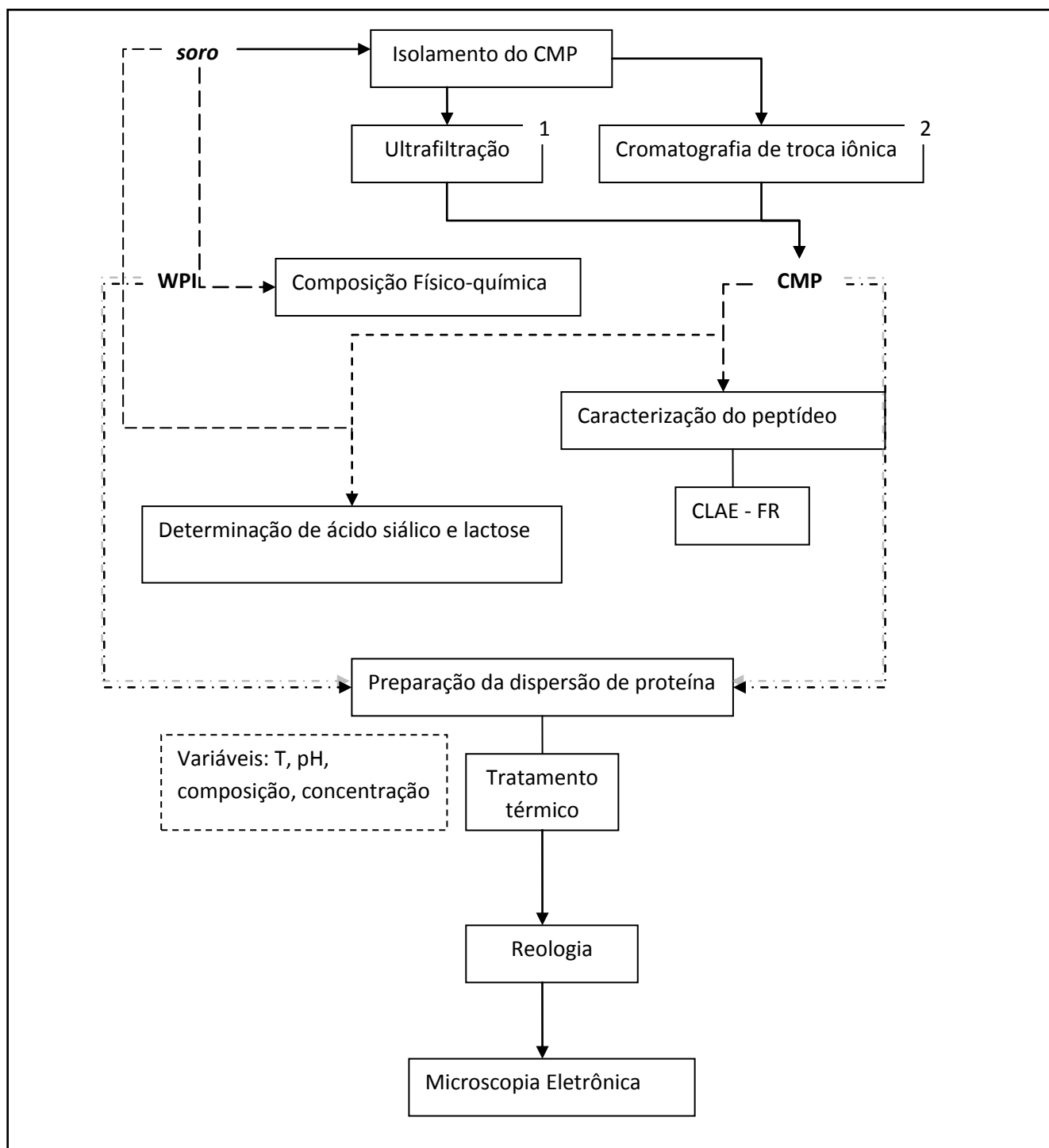


FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA

NOTAS: CMP – caseinomacropeptídeo isolado pelo processo 1 e 2, a partir do soro do leite
 CLAE-FR – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

Finalizando os três processos de separação, foram obtidas quatro amostras contendo CMP, as quais foram codificadas como: SPD, F2, R5R30 e R30. A amostra F2 é proveniente da fração 2 obtida do processo de cromatografia de troca iônica, a amostra SPD é proveniente do processo de ultrafiltração com secagem em *spray dryer*, a amostra R5R30 é procedente de ultrafiltração com secagem por liofilização. A amostra R30 é oriunda da ultrafiltração em que a última etapa foi o retentado da membrana de 30 kDa com secagem por liofilização. Tais amostras de CMP foram utilizadas para obtenção das dispersões de proteína, tendo como objetivo a formação de gel.

3.3.1 Isolamento do CMP por Ultrafiltração

3.3.1.1 Reconstituição do Soro

Foram reidratados cerca de dois quilos de soro de leite em pó em um litro de água destilada, sendo homogeneizado até completar a dissolução total.

Devido ao alto teor de lactose, essa se apresentou na forma de cristais. Assim, a lactose foi separada por filtração em forma (meio filtrante) utilizada para dessoragem de queijo. O resíduo foi lavado com água destilada até que a quantidade do filtrado a ser coletado completasse cerca de três litros.

Os cristais de lactose retidos no filtro foram descartados e o filtrado foi utilizado para as próximas etapas do processo, sendo chamado de solução de soro.

3.3.1.2 Pré-tratamento

A solução de soro reconstituído, após a remoção da lactose, foi submetida ao pré-tratamento à temperatura de 80 °C por 30 minutos. Decorrido isso, foi resfriada até temperatura de 30 °C e centrifugada a 5200 g a 4 °C por 20 minutos.

3.3.1.3 Ultrafiltração

Para ultrafiltração foi utilizado somente o sobrenadante resultante da centrifugação. O precipitado, formado pelas proteínas desnaturadas do soro reconstituído, foi descartado do processo. O sobrenadante resultante teve pH padronizado para 7,0. Após isso, foi ultrafiltrado em membrana de 50 kDa, resultando em um permeado e um retentado de 50 kDa, conforme mostra o fluxograma da FIGURA 11. O retentado foi descartado, sendo o permeado a fração que importa para a obtenção do CMP. A partir do permeado de 50 kDa foi feita novamente a ultrafiltração em membrana de 30 kDa, resultando em um novo retentado de 30 kDa e permeado de 30 kDa. Estes, por conseguinte, foram novamente ultrafiltrados, separadamente, em membrana de 5 kDa. Os permeados de 5 kDa foram descartados e os retentados de 5 kDa foram destinados a mais uma etapa do processo, a liofilização.

O retentado de 5 kDa proveniente do retentado de 30 kDa é a fração que provavelmente está o CMP, devido ao seu tamanho de 45 kDa. Por esse motivo, foram feitos duas vezes tais etapas de ultrafiltração modificando somente a etapa de secagem. Em um dos processos foi utilizada a liofilização e em outro processo foi usado o método de *spray dryer* para secagem do retentado de 30 kDa.

Todas as etapas de ultrafiltração foram acompanhadas de diafiltração com o objetivo de tornar a separação mais eficiente. A pressão de alimentação utilizada para ultrafiltração foi de 1 bar.

O equipamento empregado no processo de isolamento do CMP pelo processo de ultrafiltração aparece na FIGURA 12.

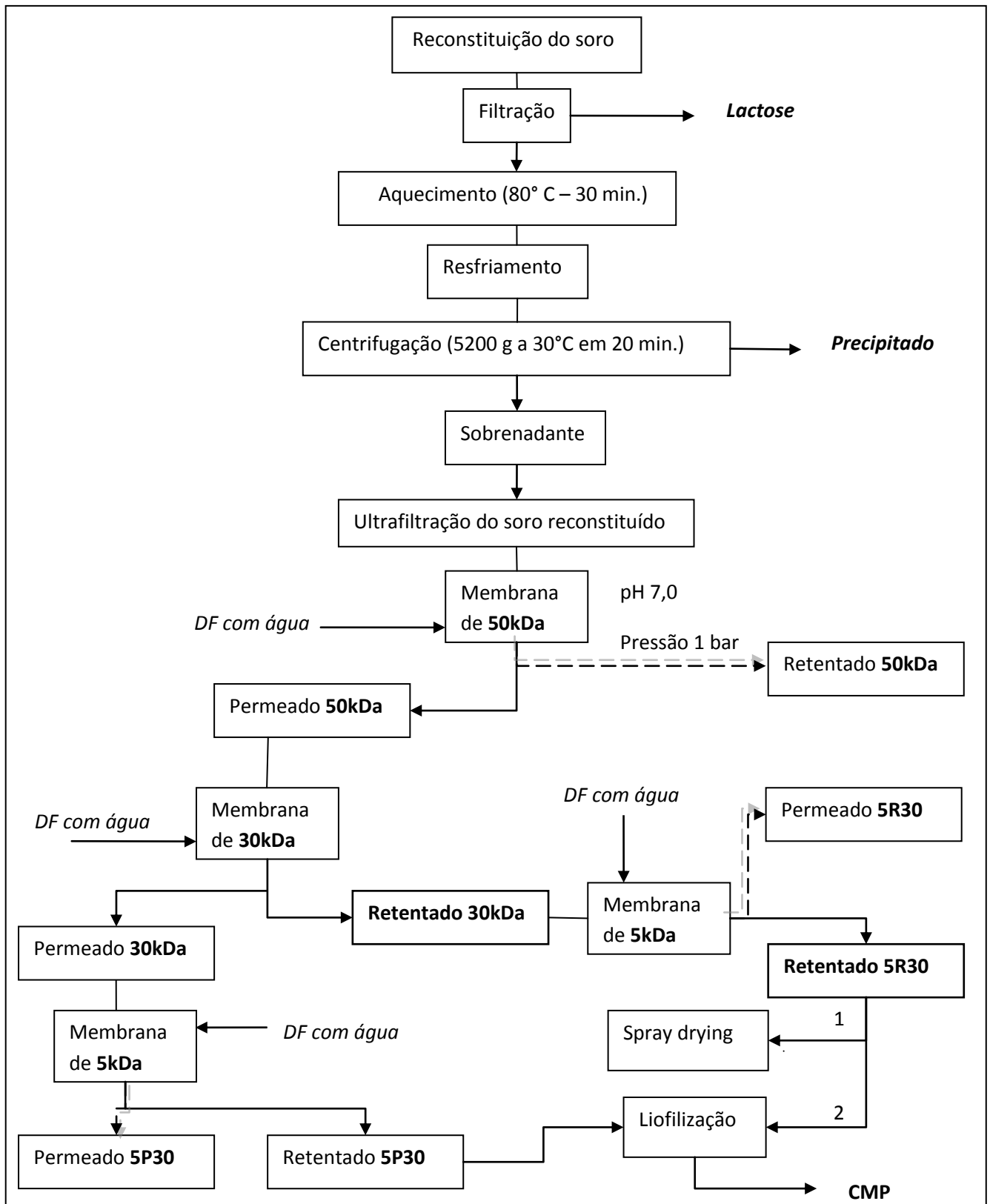


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO CMP POR ULTRAFILTRAÇÃO

NOTA: DF- diafiltração; 5P30 – membrana de 5 kDa provinda do permeado da membrana de 30 kDa; 5R30 - membrana de 5 kDa provinda do retentado da membrana de 30kDa.



FIGURA 12 – EQUIPAMENTO DE ULTRAFILTRAÇÃO

3.3.2 Isolamento do CMP por cromatografia de troca iônica

Foi preparada uma solução com 14 gramas de soro de leite em pó mais solução de acetato de sódio a pH 3,5 com volume final ajustado para 300 mL. Esta solução foi aplicada a uma coluna com diâmetro de 4,0 cm e comprimento de 40 cm contendo resina trocadora de ânion DEAE-Sephacel, equilibrada com a mesma solução de acetato de sódio a pH 3,5. (FIGURA 13).

O CMP e as outras proteínas do soro do leite adsorvidos na coluna foram eluídos com solução de cloreto de sódio 1M. Foram coletadas cinco frações de 300 mL, das quais foram retiradas alíquotas para análise de ácido siálico e de proteína.

As frações F2, F3 e F4 foram submetidas à ultrafiltração com diafiltração em membrana de “cut off” 5 kDa, para a eliminação do cloreto de sódio. Em seguida, as três frações foram congeladas e submetidas à liofilização. O produto obtido foi recuperado, pesado e parte utilizada para quantificação da proteína, lactose, cinzas e ácido siálico (TULLIO, 2007).

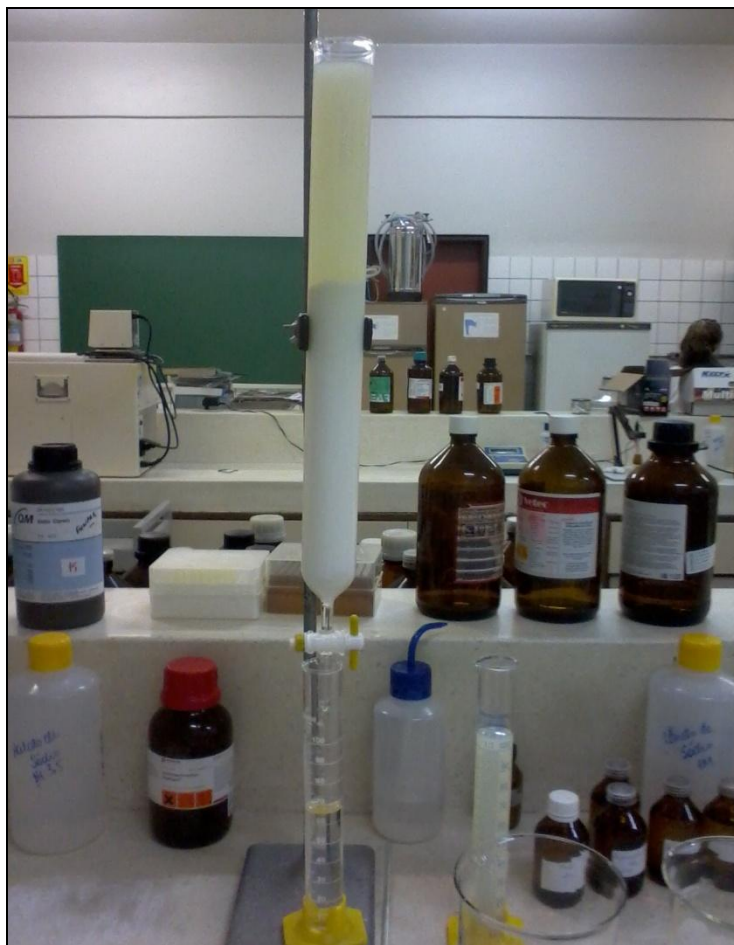


FIGURA 13 – IMAGEM DA COLUNA COM RESINA E SOLUÇÃO UTILIZADA PARA O ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRADIA DE TROCA IÔNICA

O fluxograma de isolamento do CMP está mostrado na FIGURA 14.

Parte das frações F2, F3 e F4 foi dessalinizada em membrana de 5 kDa (1) e outra parte foi liofilizada diretamente (2).

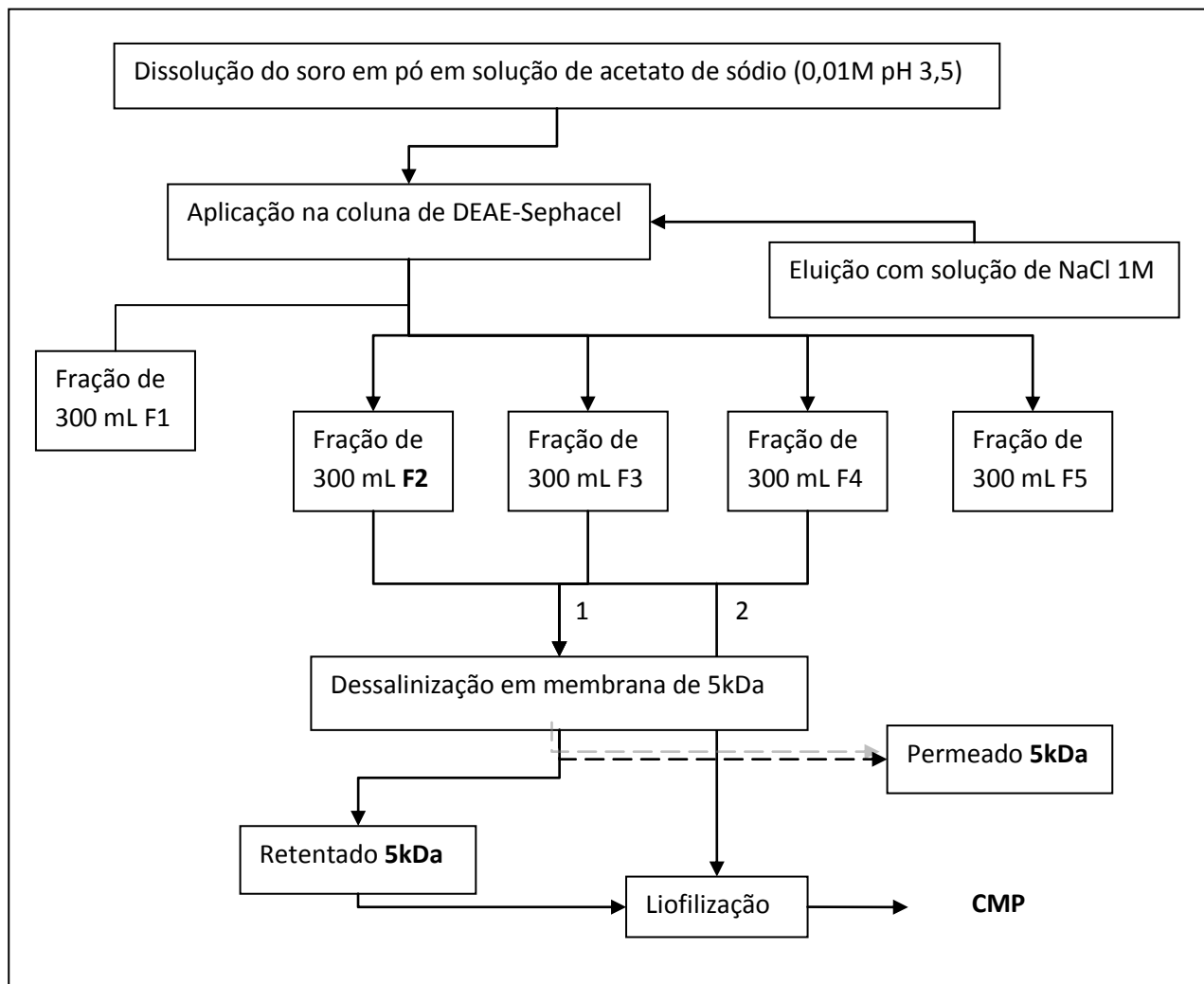


FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRÁFIA DE TROCA IÔNICA
 NOTA: CMP - caseinomacropeptídeo

3.3.3 Composição Físico-química

As determinações de umidade, cinzas, proteínas, e lipídeos foram realizadas em triplicata de acordo com o método oficial AOAC (2010). Para determinação da umidade foram utilizadas 5g de amostra, os quais foram pesados em pesa-filtros padronizados com tampa e levados a estufa a 105°C com circulação de ar até obter massa constante. As cinzas foram determinadas utilizando 5g de amostra. Foram pesados em cadinhos de porcelana padronizados, carbonizados em chapa elétrica e incinerados em mufla a 550 °C até a obtenção de cinzas brancas. A determinação

de lipídeos foi realizada em 5g de amostra e a extração pelo método de Soxhlet efetuada com éter de petróleo. A proteína bruta foi medida pelo método de Kjeldahl em 0,2 g das amostras. Para titulação foi utilizada solução padronizada de ácido sulfúrico 0,2N. Para conversão de nitrogênio em proteína, foi utilizado o fator de converção 6,38, o qual é adotado para proteína do leite.

A análise estatística realizada para comparar os dados de composição físico-química do soro foi o teste de ANOVA e o teste de Tukey (software Statistica).

3.3.4 Determinação do Ácido Siálico

Foi utilizada a metodologia adaptada da ninhidrina ácida aplicada por FUKUDA (2004) em seu experimento para determinação do ácido siálico de leite. A cada 0,5 mL dos soros de leite iniciais, foram acrescentados 0,5 mL de ácido tricloroacético a 20%. Após homogeneização e repouso por 30 minutos, a mistura foi centrifugada a 2000 g por 20 minutos e temperatura de 4 °C.

Foram tomadas alíquotas do sobrenadante de 0,1 mL para os soros iniciais e de 0,5 mL para os retentados e permeados das etapas de ultrafiltração. Para as frações da cromatografia de troca iônica foram tomadas alíquotas de 1,5 mL que foram precipitadas com 0,50 mL de ácido tricloroacético a 20%. Após homogeneização, repouso de 30 minutos e centrifugação a 2000 g por 20 minutos e 4°C de temperatura, alíquotas de 0,7 mL dos sobrenadantes foram submetidas à análise.

A determinação do ácido siálico foi efetuada com 0,2 g de soro em pó e 0,06 g do R5R30, R30 e F2 liofilizados. Em seguida as amostras pesadas foram dissolvidas em 10 mL de água e retiradas alíquotas de 0,5 mL para a precipitação com ácido tricloroacético a 20% e alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes para a determinação.

Todas as amostras acima, após terem o volumes das alíquotas completados para 1 mL, foram adicionadas de 1mL de ácido acético glacial e 1mL do reagente de ninhidrina ácida (1g de ninhidrina, 16 mL de ácido clorídrico P.A. e 24 mL de ácido glacial P.A.). Seguida a homogeneização, foram submetidas a banho-maria fervente

por 10 minutos e posterior resfriamento em banho de gelo, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro UV/Vis (comprimento de onda de 470 nm) contra branco dos reagentes. As leituras foram comparadas com uma curva padrão de ácido siálico.

3.3.5 Determinação da Lactose

O conteúdo de lactose foi quantificado pelo método de FOLIN e WU (1920).

Foram pesados 0,1g da amostra de soro de leite em pó, 1 g de R5R30, F2, F4 e R30. Nestas amostras foram adicionados 2 mL de solução de tungstato de sódio 10% seguido de 2 mL (gota a gota) de solução de ácido sulfúrico 2/3N, para precipitação das proteínas. Após mistura e descanso por cinco minutos o volume foi completado até 100 mL com água destilada. Foi filtrado em papel de filtro Whatmann n1, descartando-se os primeiros 5 mL. Aliquotas de 0,5 mL das soluções compostas pelo soro de leite em pó e de 1 mL das soluções de R5R30, F2, F4 e R30 foram transferidas para tubos de Folin Wu sendo seus volumes completados para 1 mL de água destilada.

A seguir, foram adicionados 2 mL do reagente alcalino de cobre a cada tubo e levados a banho-maria por oito minutos. Após resfriamento em banho de gelo foram adicionados 4 mL do reativo de Folin Wu em cada tubo e o volume completado para 25 mL com água destilada. Após homogeneização foi feita a leitura a 520 nm contra branco dos reagentes. As leituras foram comparadas a uma curva padrão de lactose pré-estabelecida.

3.3.6 Análise do Perfil do CMP das Frações do Soro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase-Reversa (CLAE-FR)

As análises cromatográficas dos perfis de caseinomacropeptídeos das amostras foram adaptadas da metodologia proposta por THOMA, KRAUSE e KULOZIK (2006) e realizadas em cromatógrafo Agilent 1200 series, composto por

um sistema de bomba quaternária, um módulo de injeção automática e um detector provido de feixe de arranjo de fotodiodo. A coluna utilizada foi uma OmniSpher C18 com 250 mm de comprimento por 4,6mm de diâmetro, composto por partículas de 5 micras. O fluxo utilizado nas análises foi de 1 mL/min a temperatura ambiente (25°C). A eluição das amostras foi realizada utilizando um sistema de gradiente binário, sendo o solvente A formado por 0,1% de ácido trifluoroacético em água destilada e o solvente B com 0,05% de ácido trifluoroacético em acetonitrila:água 80:20 (v/v). Os parâmetros do gradiente foram os seguintes: 0 a 2 minutos estabilização do sistema em 90% de A, de 2 a 14 minutos 51% de A seguido de 100% de B em 5min, mantendo-se isocrático por 2 minutos para então retornar a situação de equilíbrio inicial em 2 minutos.

As amostras provenientes da ultrafiltração e da cromatografia em troca iônica foram liofilizadas e posteriormente diluídas a 10mg/mL em água pura, filtrada em membranas de acetato de celulose Millipore de 0,22µm e uma alíquota de 30µl foi utilizada para injeção na CLAE-FR. O padrão comercial de CMP da Sigma-Aldrich foi utilizado em solução a 5 mg/mL e mesmo volume de injeção. O monitoramento do cromatograma foi realizado em tempo real nos comprimentos de onda de 214 e 226 nm. Em alguns casos foram realizadas varreduras nos picos do cromatograma na região do UV nas faixas de absorção de 190 a 350 nm.

3.3.7 Preparação da Dispersão da Proteína

As amostras R5R30 e F2 produzidas pelo processo de isolamento por ultrafiltração e troca iônica respectivamente, foram pesadas de forma que proporcionasse as concentrações requeridas nas soluções puras e em demais misturas com WPI, de acordo com o planejamento experimental descrito na TABELA 03. Foram dissolvidas em água milliQ à temperatura ambiente sob agitação por 15 minutos em agitador magnético. Foi completado o volume para 25 mL em balão volumétrico e levado ao banho de ultra-som por 10 minutos. Foram usadas concentrações de 10% a 50% (w/w) para a dinâmica de medidas reológicas.

O planejamento experimental foi aplicado para determinação da influência de interações entre as concentrações das proteínas do soro do leite CMP e WPI em

forma de gel. As variáveis foram estabelecidas em três níveis representando concentração de 15%, 20% e 30% da fração de proteína (WPI ou fração de CMP). Foram realizados seis tratamentos de composição do gel conforme TABELA 03.

TABELA 03 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA DUAS VARIÁVIES E TRÊS NÍVEIS (15%, 20%, 30%) UTILIZADOS NO EXPERIMENTO DO GEL DE PROTEÍNA

TRATAMENTOS	Dispersão de proteína (g/25mL)	
	WPI	CMP
1	5	0
2	7,5	0
3	3,75	3,75
4	0	7,5
5	7,5	3,75
6	7,5	5

3.3.8 Preparação de Géis Induzidos pelo Calor

A fim de preparar géis induzidos por calor, as amostras foram transferidas para tubos de plástico (seringas adaptadas) com diâmetro de 2,5 cm e comprimento de 10 cm e imersos em banho-maria a 70 °C a 80 °C por cerca de 30 minutos. Depois do tratamento térmico, os géis foram imediatamente resfriados em banho de gelo e armazenados a 10±1 °C por 24 h.

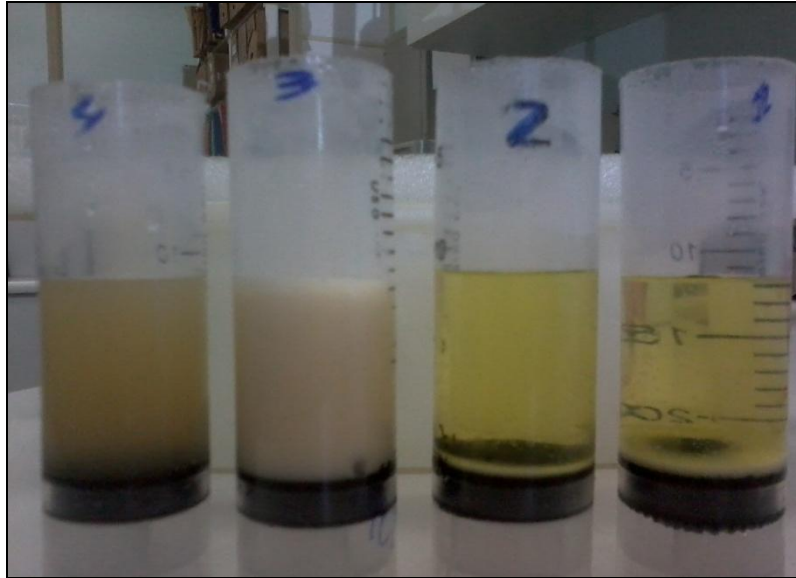


FIGURA 15 – AMOSTRAS APÓS TRATAMENTO EM BANHO-MARIA

O planejamento das variáveis do tratamento térmico para obtenção da formação de gel da dispersão de proteína foi estipulado conforme mostrado na tabela 04.

TABELA 04 – VARIÁVEIS DO TRATAMENTO DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA

Temperatura (°C)	60		70		80
Tempo (min.)	30		20		15
Concentração (p/p)	20%		30%		50%
Composição	WPI	R5R30	R30	SPD	F2

3.3.9 Comportamento Reológico dos Géis

As análises reológicas foram conduzidas em reômetro tipo Cone e Placa Rheostress RS 75 HAAKE, junto com o sistema Peltier TC 81 HAAKE e banho termo circulante DC5 HAAKE para controle da temperatura. Trata-se de um viscosímetro rotacional que serve para determinar as propriedades reológicas de líquidos Newtonianos e não Newtonianos. Os dados foram tratados pelo software RHEOWIN 3 JOB MANAGER. Para análise das amostras de gel foi utilizado o sistema de medida cone-placa com o rotor modelo PP35/s. As leituras foram feitas dentro de um período de 24 horas após o preparo dos géis, à temperatura ambiente (25 °C). As amostras armazenadas a 10 °C foram deixadas à temperatura ambiente (± 25 °C) antes da leitura.

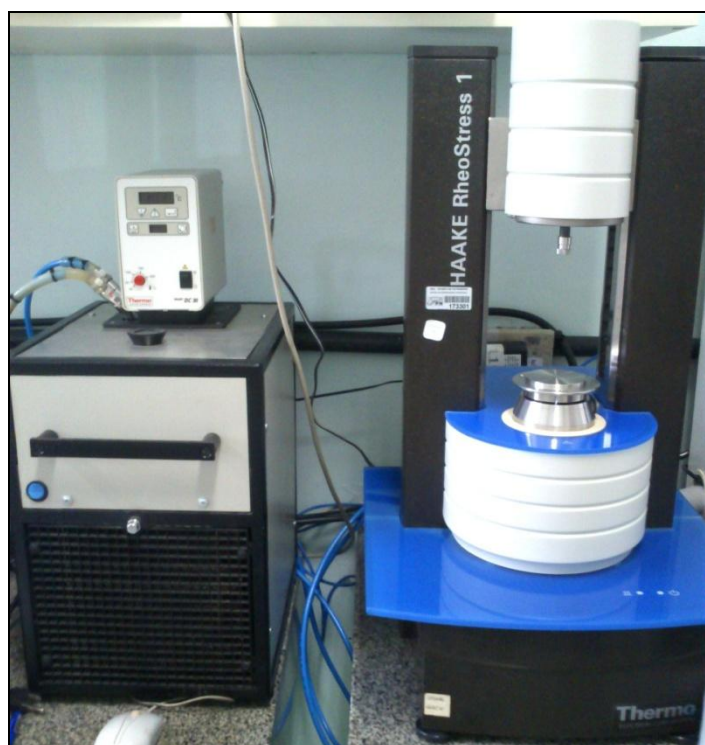


FIGURA 16 – REÔMETRO TIPO CONE E PLACA UTILIZADO PARA ANÁLISE

Uma quantidade de amostra necessária para cobrir toda a superfície do sistema Cone e Placa foi colocada sobre a placa, sendo o excesso da amostra removido cuidadosamente com espátula.

3.3.9.1 Caracterização das Propriedades Reológicas por Análises Oscilatórias

A varredura de tensão foi realizada em condições controladas de temperatura a 25°C, com variação da amplitude de tensão (FIGURA 17) de 1 Pa até 50 Pa. Como a faixa de viscoelasticidade linear (RVL) é dependente da frequência, o teste foi realizado com a frequência em 0,05 Hz e a 10 Hz. O resultado foi a medida do módulo complexo G^* e do ângulo de fase δ na faixa de tensão estabelecida.

A RVL foi estabelecida para que não ocorram desvios dos modelos que descrevem o comportamento dos materiais. Também, para que a deformação não destruísse as ligações internas temporárias de agregados ou moléculas, gerando perda da viscosidade e perda irreversível de parte da energia em forma de calor (SCHRAMM, 2006).

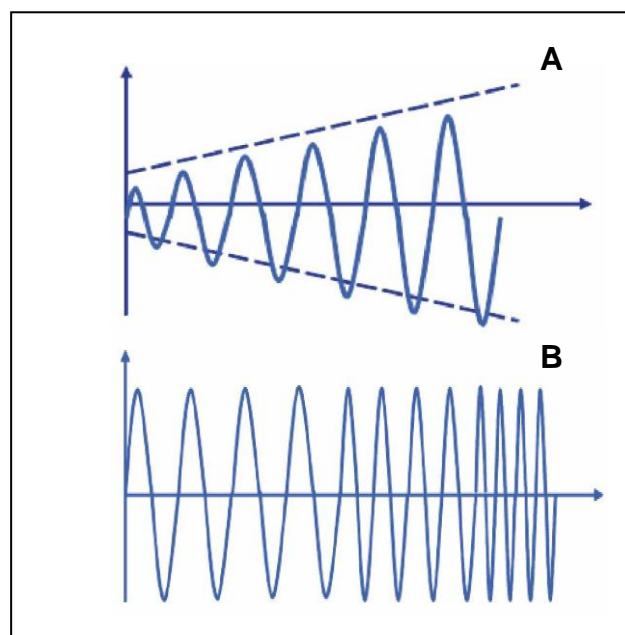


FIGURA 17 – TESTE DINÂMICO DE VARREDURA DE: TENSÃO (A) EM FREQUÊNCIA CONSTANTE E FREQUÊNCIA (B) EM TENSÃO CONSTANTE
FONTE: BRUMMER (2006)

A varredura de frequência foi realizada a 25 °C, com uma variação de frequência (FIGURA 17) de 0,05 Hz até 10 Hz, dentro da região viscoelástica linear

de tensão a uma tensão constante em torno de 5 Pa (dependendo da amostra). Como resultados foram obtidos os valores dos módulos elástico G' , viscoso G'' e viscosidade complexa η^* em função da frequência. Tais informações possibilitaram a comparação do perfil viscoelástico característico dos sistemas formados.

3.3.10 Microestruturas do Gel

3.3.10.1 Para Superfície Externa do Gel

As micrografias dos géis foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram processadas da seguinte forma:

- Lavadas quatro vezes em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 a 37°C;
- Fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2,0%, paraformaldeído 4,0%, CaCl_2 1 mM em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2-7,4) por 1 hora;
- Novamente lavadas uma vez em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2-7,4;
- Pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão Cacodilato de sódio 0,1 M – pH 7,4) por 1 hora;
- Lavadas uma vez em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2-7,4;
- Desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, duas vezes 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração;

Já no Centro de Microscopia Eletrônica, submeteu-se ao ponto crítico no aparelho CPD 010 (Critical Point Dryer) 030 – Balzers e, em seguida, foram metalizadas com ouro no equipamento Balzers Union, modelo SCD 030.

3.3.10.2 Para Estrutura Interna do Gel

Na técnica de Quebra, as amostras de gel foram suavemente lavadas com gradiente de glicerol, de 15, 30 e 50% em tampão cacodilato 0,8 M (pH 5,7) durante 15 minutos cada e enxaguado. Estas amostras foram transferidas para um recipiente cheio com azoto líquido e fraturado por meios mecânicos (FU *et al.*, 2007) e, em seguida, os fragmentos foram suavemente lavados com gradiente de glicerol em tampão cacodilato 0,8 M (pH 5,7) durante 15 min. novamente. Posteriormente foram desidratadas através de uma série de etanol de concentração crescente (20 a 99%), em seguida, elas foram secas através de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030 - secador de ponto crítico). Os espécimes foram montados em pregos de cobre e revestido com ouro-paládio (SCD 030 - Balzers Union FL 9496).

Todas as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6360 LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE com capacidade de zoom de 800X. As magnitudes das imagens do gel utilizadas foram de: 500, 2.000, 3.000 e para a estrutura interna de 10.000 vezes. As micrografias foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA

Os resultados das análises de composição química dos dois lotes de soro de leite, empregados como matérias-primas para isolamento do CMP, encontram-se na TABELA 05.

TABELA 05- COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE DOIS LOTES DE SORO DE LEITE EM PÓ UTILIZADOS COMO MATÉRIA-PRIMA PARA EXTRAÇÃO DO CMP

SORO	Concentração (g/100g)	Concentração (g/100g)
Umidade	5,976 ± 0,29 ^A	2,55 ± 0,02 ^B
Cinzas	5,26 ± 0,031 ^A	4,92 ± 0,023 ^B
Proteína	13,37 ± 0,073 ^B	15,48 ± 0,32 ^A
Gordura	1,70 ± 0,074 ^A	1,86 ± 0,001 ^A
Lactose	65,54 ± 1,75 ^B	68,20 ± 0,34 ^A

NOTAS: Os dados representam média de três repetições ± desvio-padrão.

Apresentaram diferença significativa com $p < 0,05$ os teores de umidade ($p = 0,000029$), cinzas ($p = 0,000001$), proteínas ($p = 0,000036$) e lactose ($p = 0,001081$). No entanto foi observado diferença não-significativa no teor de gordura com p igual a 0,130429.

O soro do leite é subproduto da fabricação do queijo. O leite, por sua vez, possui muita variação na sua composição devido a vários fatores do seu processo de produção. Podem ser fatores da variação: raça da vaca, alimentação, manejo, temperatura ambiente, estágio de lactação, produção industrial do leite (pós-ordenha), entre outros. Por esse motivo, existe diferença significativa na composição do leite e, conseqüentemente, na composição do soro do leite.

De acordo com o relato de GEOFFREY (1991), ocorre mudança sazonal, geralmente incluído redução do teor de α -lactalbumina, aumento do nível de beta-lactoglobulina e aumento da caseína, no conteúdo de concentrado protéico de soro fabricado durante os três meses finais da lactação. Esta variação sazonal na produção de leite é associada a uma variação na composição semelhante de leite, bem como o desempenho funcional do concentrado protéico do soro de leite (WPC) resultante. Outro exemplo da variação sazonal na composição do leite é particularmente durante os meses mais secos do verão.

O teor de gordura é o único que mostrou diferença não-significativa. Tal agente dessa não-significância é a padronização do teor de gordura feita pela indústria. A indústria classifica os tipos de leites comerciais com base no teor de gordura. São exemplos: leite integral, leite semi-desnatado, leite desnatado. Além disso, ocorreu uma etapa de padronização da gordura no processo industrial do soro. Segundo a empresa SOORO (2011), o soro passa por um trocador de calor, onde é pré-aquecido a 80°C por aproximadamente 4 minutos. Em seguida, passa por centrífuga que desnata e clarifica, gerando um creme como sub-produto e o soro desnatado. Na sequência, o soro é concentrado através da filtração por membranas, onde 2/3 do componente água da composição é retirada. Depois a concentração é feita por evaporadores tubulares de múltiplos estágios, assim como a pasteurização. Por último, o produto passa pela secagem por *spray dryer*. Segundo esta descrição do processo da Sooro, pode-se questionar sobre a umidade, que pela etapa do *spray dryer* é também padronizada na indústria. Porém, nas análises da composição físico-química se mostraram com diferença significativa. A explicação para isso, é que ao sair da indústria o soro é embalado, armazenado e transportado no decorrer do trajeto até chegar ao consumidor e ao consumo-final propriamente dito. Se essas etapas de embalagem, armazenamento e transporte falharem na proteção do produto seco, com o decorrer do tempo este capta umidade do ambiente. Pode ser a explicação para a diferença do teor de umidade entre os dois lotes do soro do leite.

Para fazer o gel a base de proteína do soro do leite, foi utilizado como matéria-prima o WPI (isolado protéico de soro). O resultado da determinação da composição centesimal encontra-se na TABELA 06.

TABELA 06- COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ISOLADO PROTÉICO DO SORO DE LEITE (WPI)

WPI	Concentração (g/100g)
Umidade	3,45 ± 0,06
Cinzas	2,15 ± 0,002
Proteína	92,31 ± 2,21
Gordura	1,31 ± 0,053
Lactose	0,92 ± 0,18

NOTAS: Os dados representam média de três repetições ± desvio-padrão.

4.2 ISOLAMENTO DO CMP POR ULTRAFILTRAÇÃO

O soro utilizado para o processo de ultrafiltração possui 15,48% de proteína, conforme a TABELA 05. Foi utilizada uma massa de 2,310 kg de soro para esse processo, o teor de proteína por cálculo seria de 358,05 g no volume total (soro em pó dissolvido em água), mas o valor obtido por análise foi de 357,56 g. Entre a dissolução do soro em pó em água e a etapa de filtração dessa solução para a retirada da lactose na forma de cristais, houve perda de 23,93% da proteína. Essa solução de soro delactosado com 272,37 g de proteína, que já passou pela filtração e posteriormente foi o ponto de partida para o tratamento térmico e a passagem nas membranas de ultrafiltração, é equivalente a 30,263 L de soro, segundo RICHARDS (2002) que menciona que o soro contém 0,9% de proteínas. Como essa solução de soro inicial foi preparada em 4,75 L, nota-se que está em forma concentrada.

Na etapa do tratamento térmico à temperatura de 80 °C por 30 minutos, parte da proteína desnaturou (mais termolábeis) e foi separada por centrifugação. As proteínas do soro do leite em ordem crescente de resistência a temperatura, são: imunoglobulinas, albumina do soro bovino, beta-lactoglobulina e a alfa-lactoalbumina. A principal mudança que ocorre durante o tratamento com temperatura acima de 70 °C é a desnaturação das proteínas do soro de leite, que induz desnaturação protéica e rearranjo de componentes de caseína na estrutura

micelar (caso seja no leite integro), seguido por uma série de agregação e reações de dissociação (OLDFIELD, SINGH e TAYLOR, 1998).

A concentração de proteína, conforme mostrado na TABELA 08, do Soro Inicial diminui drasticamente ao passar pelo tratamento térmico, que passou a ser chamado de Soro Centrifugado. Ou seja, diminuiu de 272,37 g para 164,23 g; deixando no precipitado 115,05 g do total de proteínas. É provável que, neste tratamento térmico, se tenha perdido algum conteúdo do CMP, assim como ocorrido alguma modificação estrutural.

Na TABELA 07, é mostrado que teor de lactose diminui com o tratamento de 68,20% até 11,40% no volume total. De outra forma, é exposto que, com o tratamento, ficou no soro somente 25,11% do total de lactose inicial. A maior quantidade retida de lactose, com cerca de 43,87%, foi através da filtração inicial da solução de alta concentração do soro em pó, no qual a lactose cristalizada foi separada. A redução do teor de lactose foi superior a 75% ao longo de todo o processo.

TABELA 07 – CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NOS VOLUMES DAS ETAPAS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

Etapas	Lactose (g)	Volume Total	Lactose (%)
Soro em pó	1575,44	2310 g	68,20
Soro Delactosado	1155,51	4750 mL	24,33
Precipitado	253,61	1280 mL	19,81
Soro Centrifugado	395,51	3470 mL	11,40

NOTAS: * Média de duas repetições \pm desvio-padrão. Ver fluxograma da FIGURA 05.

A FIGURA 18 mostra as diferenças de aspecto das frações separadas pelas membranas de 30 kDa e 50 kDa da ultrafiltração, sendo o número 1, o retentado de 50 kDa; o número 2 o permeado de 50 kDa e conseqüente retentado da membrana de 30 kDa e o número 3, o permeado da membrana de 30 kDa. De acordo com dados de literatura, o tamanho molecular do CMP está na faixa de 45 kDa em pH 6 a 7, e portanto, estaria presente na solução 2.

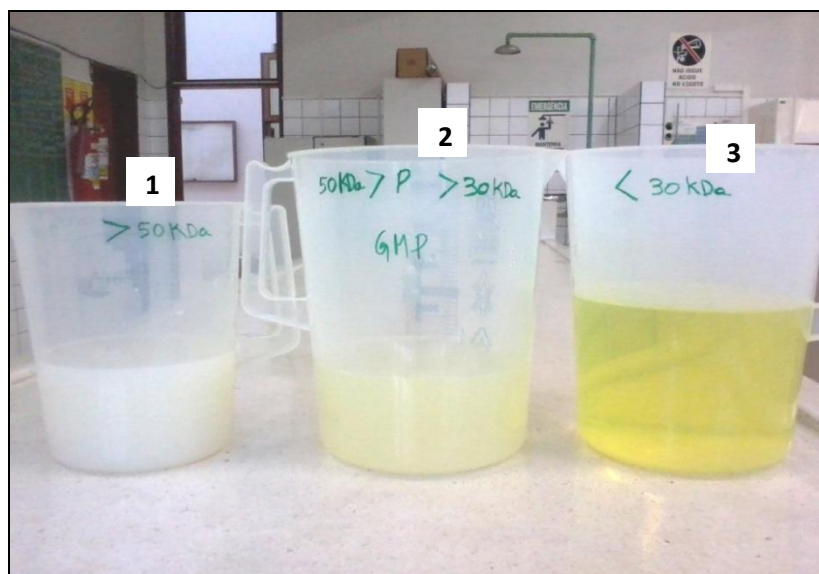


FIGURA 18 – FRAÇÕES RESULTANTES DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO DO SORO DO LEITE

NOTA: 1 – retentado de 50 kDa; 2 – entre 50 kDa e 30 kDa; 3 – permeado de 30 kDa.

O teor de ácido siálico e proteína das diferentes frações aparecem na TABELA 08.

TABELA 08 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NAS FRAÇÕES DO PROCESSAMENTO DO SORO DE LEITE

Etapas	Ácido Siálico no Volume Total (mg)	Proteína no Volume Total (g)	Relação Ácido Siálico (mg)/ Proteína (g)
Soro em pó	---	357,56 ± 7,23	---
Soro Delactosado	2856,55	272,37 ± 6,11	10,49
Precipitado	---	115,05 ± 1,73	---
Soro Centrifugado	3199,58	164,23 ± 8,93	19,48
P50	2411,51	77,99 ± 1,36	30,92
R50	1412,25	78,09 ± 0,74	18,08
P30	1444,70	17,39 ± 1,17	83,06
R30	621,11	26,35 ± 0	23,57
R5P30	675,31	14,20 ± 0	47,56
R5R30	342,94	23,86 ± 0,59	14,37
P5P30	---	3,53 ± 0	---
P5R30	---	2,50 ± 0	---

NOTAS:* Média de duas repetições ± desvio-padrão; R = retentado; P = permeado. Ver fluxograma da FIGURA 05.

Na FIGURA 19 são mostradas as concentrações do ácido siálico, da proteína e a relação entre elas. A maior relação na fração significa indício de CMP. Assim, os dados sugerem que o CMP estaria nas frações P30 e R5P30. No entanto, não é o que ocorre comparando com a posterior análise em HPLC.

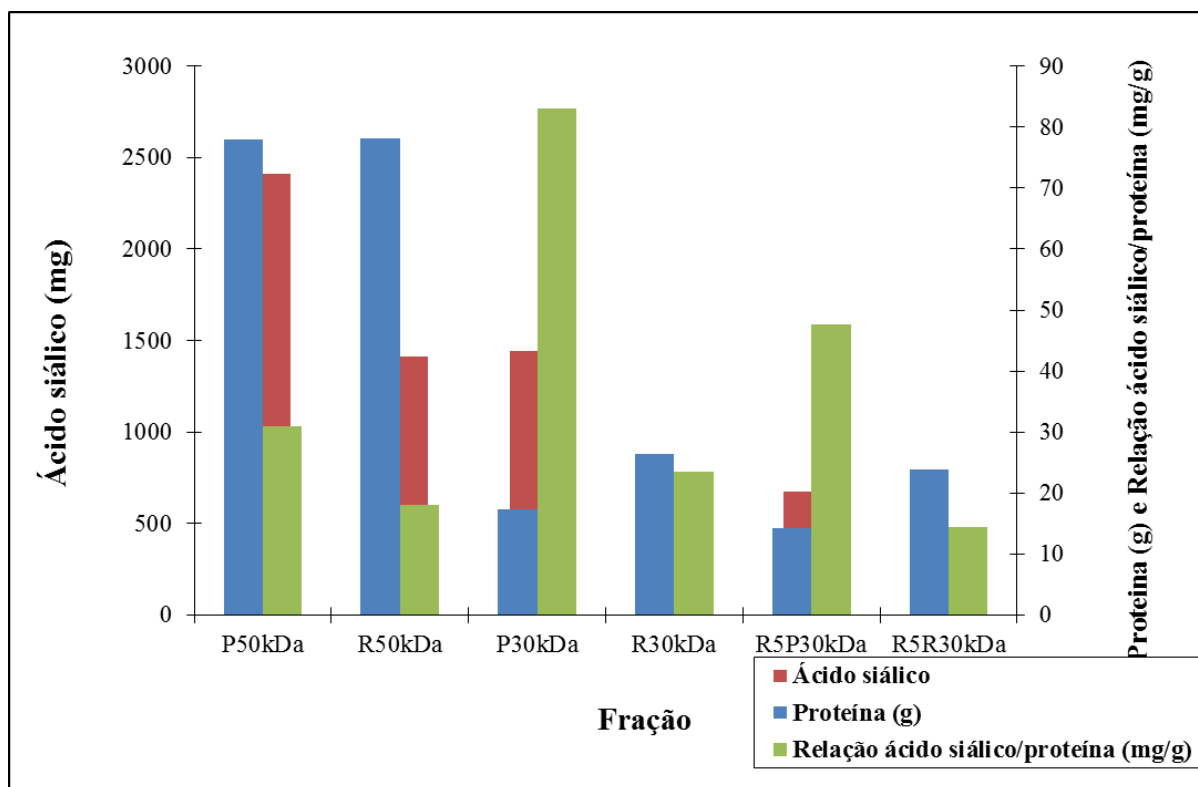


FIGURA 19 – GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SIÁLICO, PROTEÍNA E RELAÇÃO DESTES EM DIFERENTES ETAPAS DA ULTRAFILTRAÇÃO

A determinação do ácido siálico pode ser tomada como uma medida da concentração de CMP. Os métodos clássicos para a determinação do CMP baseiam-se na determinação dos componentes solúveis nitrogenados em soluções TCA. No entanto, a validade desta abordagem é imprecisa em vista da descoberta de que a variação na composição em hidratos de carbono é responsável pela variação da solubilidade de CMP em soluções de TCA. A adição de TCA 12% (m/v) para o conjunto de CMP (glicosilada ou não glicosilada) leva à precipitação do CMP não glicosilado, mas não do CMP contendo hidratos de carbono (ARMSTRONG *et al.*, 1967; CREAMER *et al.*, 1973). Assim, sabe-se que as diferentes formas não

glicosiladas e glicosilada do macropeptídeo têm sensibilidades diferentes para precipitação em TCA (VREEMAN *et al.*, 1986). Além da heterogeneidade do CMP, este apresenta delicada natureza das formas glicosiladas que podem alterar em decorrência do processo de tratamento térmico e mudança de pH.

Conforme relatado por FERRON *et al.* (1992) em estudo, houve diminuição na quantidade de CMP libertado e isolado a partir de leite com o aumento da severidade do tratamento térmico.

Foram feitos dois processamentos. No primeiro o material foi seco por liofilização e no segundo por *spray dryer*, para aproximar mais dos processos tecnológicos industriais.

Após liofilização foram obtidos 71,78 g da fração R30, 73,16 g da fração R5R30 e da secagem por *spray dryer* foi obtido 23,74 g de pó do produto (R5R30). O teor de ácido siálico foi de 2,15 g/100g, 1,86 g/100g e 2,53 g/100g, respectivamente, o que equivale a 21,5 mg, 18,6 mg e 25,3 mg de ácido siálico por g do isolado obtido em pó.

TABELA 09 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MASSA EM BASE SECA DAS FRAÇÕES LIOFILIZADOS DO PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

	R30kDa	R5R30kDa	<i>Spray dryer</i>
Proteína (g/100g)	11,94 ± 0,19	12,11 ± 0,20	23,74 ± 0,78
Lactose (g/100g)	11,85 ± 0,02	11,91 ± 0,10	12,04 ± 0
Ácido Siálico (g/100g)	2,15 ± 0,07	1,86 ± 0,03	2,53 ± 0,56
Cinzas (g/100g)	5,33 ± 0,018	5,44 ± 0,12	7,83 ± 0,10
Massa (g)	71,78	73,16	23,58

NOTAS:* Média de duas repetições ± desvio-padrão. Ver fluxograma da FIGURA 05.

Em 100 g de pó da fração R5R30, o teor de ácido siálico é de 1,86 g então em 73,16 g a quantidade de ácido siálico é de 1,41 g. O mesmo ocorre na fração R30kDa, em que o teor de ácido siálico em 100 g de pó é de 2,15 g, logo 71,78 g conterá 1,47 g de ácido siálico. De acordo com MARTIN-DIANA *et al.*(2002), a

porcentagem de ácido siálico no CMP é presente em 7 a 8%. Então nessa quantidade de 1,41 a 1,47 g de ácido siálico corresponde a 18 a 21 g de CMP. Na sequência, segundo OLIVA (2002), o CMP está presente no soro em uma concentração que varia de 1,2 a 1,5 g/L. No entanto, no estudo presente, como estes 21 g estimado de CMP são provenientes de 30,263 litros de soro de leite, a concentração de CMP neste soro é de 0,7 g/L. O rendimento do processo de ultrafiltração, de acordo com teor de 1,2 a 1,5 g de CMP por litro de soro, foi de 46,67% a 58,33%.

TULLIO (2007), em seu estudo de isolamento de CMP pelo processo de ultrafiltração em membrana de 50 kDa e 30 kDa obteve rendimento de 63,33% de CMP.

Comparando o rendimento entre os dois tipos de secagem propostas, a por liofilização obteve 21,33% de rendimento superior ao processo com secagem por *spray dryer*. Em 23,58 g do pó com secagem por *spray dryer* contém 0,58 g de ácido siálico que corresponde a 7,25 g a 8,29 g de CMP presente. Como esta estimativa de 8,29 g é proveniente de 15 litros de soro de leite, a concentração de CMP neste soro é de 0,55 g/L. O rendimento do processo com secagem por *spray dryer* foi de aproximadamente 37% de CMP.

4.3 ISOLAMENTO DO CMP POR CROMATOGRAPHIA DE TROCA-IÔNICA

Na TABELA 10 são apresentadas as concentrações de ácido siálico e proteína nos volumes de 300 mL do soro inicial e das frações coletadas da coluna, assim como a relação entre estes. No isolamento do CMP pelo processo de cromatografia de troca-iônica, o volume total de proteína e de ácido siálico de maior valor foram tidos na fração 2, assim como a relação ácido siálico proteína.

TABELA 10 – CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO SIÁLICO E PROTEÍNA NAS FRAÇÕES DAS ETAPAS DO PROCESSO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA-ÍÔNICA

Etapas	Ácido Siálico em Volume Total (mg)	Proteína em Volume Total (g)	Relação Ácido Siálico (mg)/ Proteína (g)
Soro Inicial	----	1,73±0,08	10,49
F1	----	0,55 ± 0,01	----
F2	23,83	0,76 ± 0,10	137,49
F3	1,08	0,03 ± 0	39,92
F4	0,26	0,01 ± 0	32,01
F5	0,28	0,01 ± 0	34,14

NOTAS: * Média de duas repetições ± desvio-padrão. Ver fluxograma da FIGURA 05.

Foram eluídas da coluna cinco frações de 300 mL cada a partir de 14g de soro inicial. Como esta solução possui 1,73 g de proteína e pressuposto que o soro contém 0,9% de proteínas, esta solução equivale a 0,192 litros de soro. A relação ácido siálico/ proteína mais expressiva é apontada na fração 2, como apresenta a FIGURA 20.

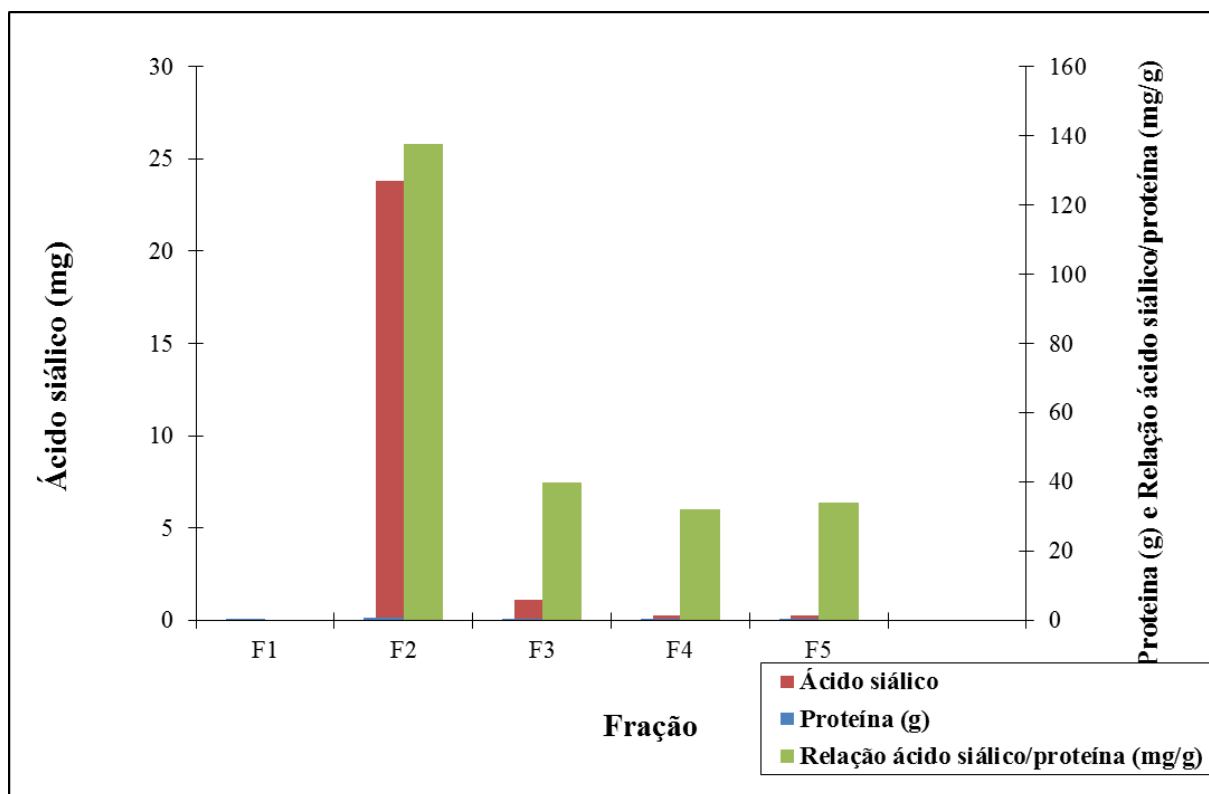


FIGURA 20 – GRÁFICO DAS CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO SIÁLICO, PROTEÍNA E RELAÇÃO DESTES NAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE TROCA-ÍÔNICA

Conforme a TABELA 10 a fração F2 apresentou teor de 23,83 mg de ácido siálico em uma massa total de 156 mg (de acordo com a TABELA 11). Assim o teor de ácido siálico é de 152,76 mg/g da fração F2 em pó.

TABELA 11 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E MASSA DA FRAÇÃO F2 LIOFILIZADA OBTIDA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA

F2	
Proteína (g/100g)	66,01 ± 4,17
Lactose (g/100g)	10,57 ± 0
Ácido Siálico (g/100g)	3,53 ± 0,04
Cinzas (g/100g)	11,63 ± 0,28
Massa (g)	1,56

NOTAS: * Média de duas repetições ± desvio-padrão. Ver fluxograma da FIGURA 05.

Comparando com o processo de ultrafiltração, que apresentou 18,3 e 25,6 mg/g de ácido siálico na fração de provável conteúdo de CMP, este processo de cromatografia é oito vezes mais eficiente.

O teor de proteína inicial foi de 1,73 g, que corresponde a 0,192 litros de soro de leite. Desta forma 23,83 mg do ácido siálico contidos na fração F2 são provenientes de 0,192 litros do soro, que equivale a 124,11 mg de ácido siálico por litro de soro. Como sabe-se que o ácido siálico está presente entre 7 e 8% no CMP, então existe 1551,43 mg de CMP nesta fração F2, ou seja o rendimento foi de 100%.

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (CLAE-FR)

O objetivo foi avaliar qualitativamente o perfil do CMP nas diversas frações dos métodos empregados, por cromatografia de troca-iônica e ultrafiltração, para a obtenção do produto desejado. Foram realizadas análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência adaptando os parâmetros de corrida utilizados por THOMA e colaboradores (2006).

A FIGURA 21 mostra o cromatograma obtido do padrão do CMP a 10mg/mL da marca Sigma-Aldrich. Pode-se observar neste cromatograma que o padrão de CMP não aparece de forma individualizada e sim de múltiplos picos co-eluídos no intervalo de tempo de retenção entre 7 e 12 minutos de corrida, impossibilitando a análise quantitativa do CMP nas condições cromatográficas utilizadas. A multiplicidade dos picos observados no padrão pode decorrer tanto da heterogeneidade da composição devido a variabilidade genética, como também das modificações pós-traducionais que ocorrem na cadeia peptídica. Majoritariamente, reações de glicosilação de alguns aminoácidos com as moléculas de galactose, N-acetilgalactosamina e ácido neuramínico, além de possíveis fosforilações do CMP.

Outro fator que pode influenciar no rendimento do processo e no perfil cromatográfico deste macropeptídeo é a interferência do método de pré-tratamento ácido utilizado. Uma vez que, a redução do pH pode induzir as perdas parciais em decorrência da modificação da solubilidade das diferentes frações peptídicas principalmente não glicosiladas (THOMA *et al.*, 2006).

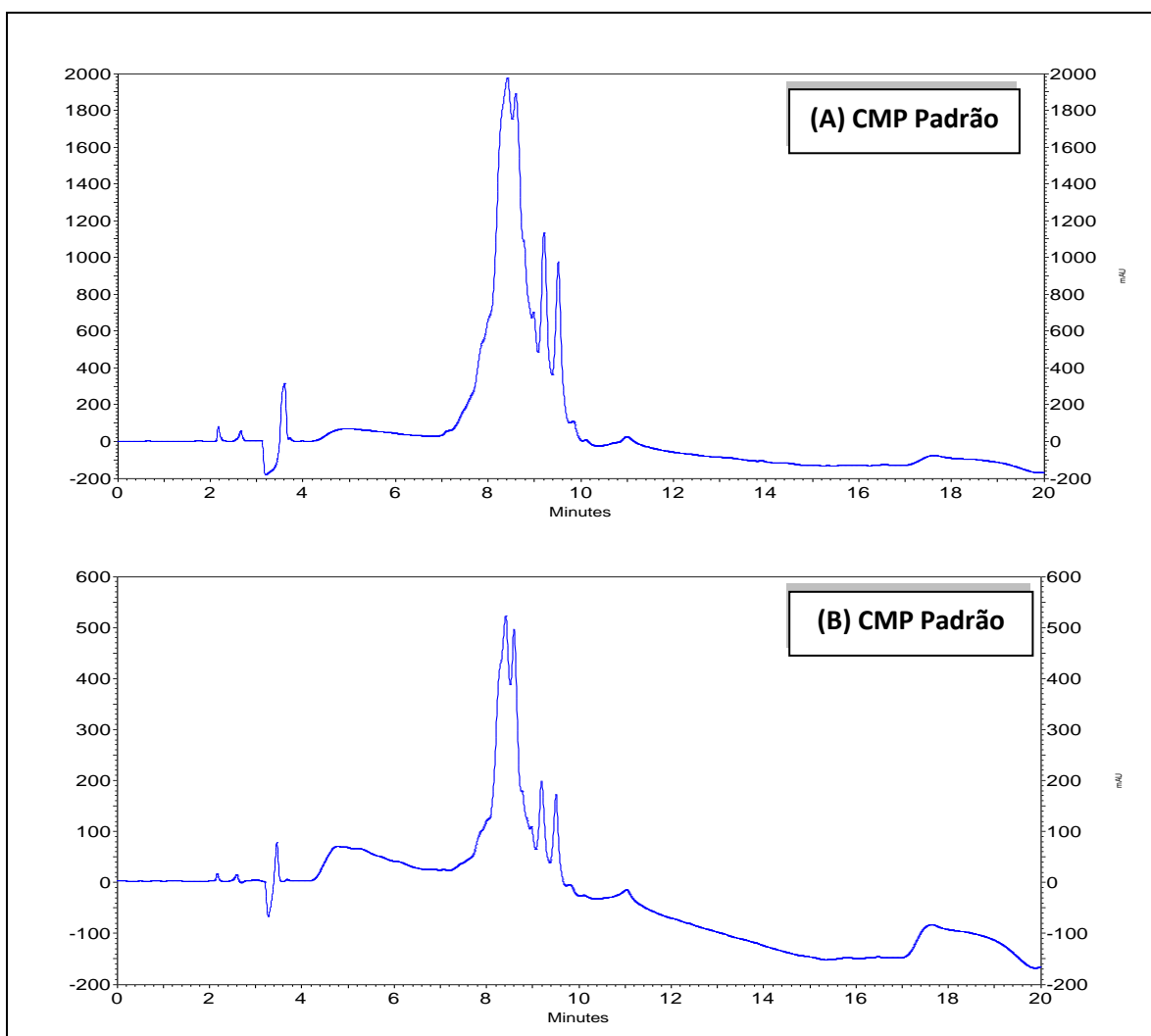


FIGURA 21 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE CMP DA SIGMA-ALDRICH NA CONCENTRAÇÃO DE 10mg/mL
NOTA: Volume de injeção de 30µL (A); volume de injeção de 5µL (B).

De todas as frações obtidas, em ambos os processos, a que apresentou a maior concentração dos CAA foi a fração F2, ou seja, a amostra da primeira fração da eluição com o cloreto de sódio 1M no método de cromatografia de troca iônica, conforme mostra a FIGURA 22.

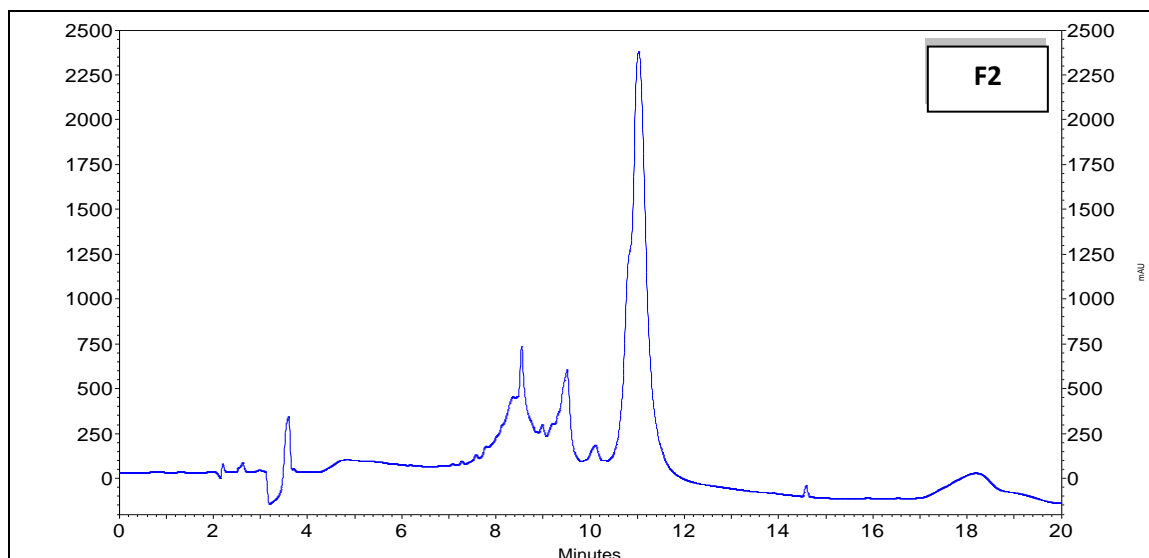


FIGURA 22 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO F2 OBTIDA PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA, A 10mg/mL E INJEÇÃO DE 30 μ L

Comparando o perfil de picos deste cromatograma com o respectivo do padrão de CMP (FIGURA 21) podemos observar também a existência de picos co-eluídos na região de 7 a 10 min. Estes picos possivelmente são os picos correspondentes ao CMP. Um pouco mais a frente, no tempo de retenção entre 10 e 12 minutos, nota-se o maior pico de todos e este aparece de forma individualizada. A presença deste pico é muito pouco significativa no cromatograma do padrão de CMP, mas, comparando este resultado com os do trabalho de THOMA et al.(2006), ao que tudo indica, este pico predominante deve ser um casomacropéptido não glicosilado, conforme podemos observar no segmento ampliado da cromatografia de soro de leite coagulado obtido por THOMA (2006) e mostrado na FIGURA 23.

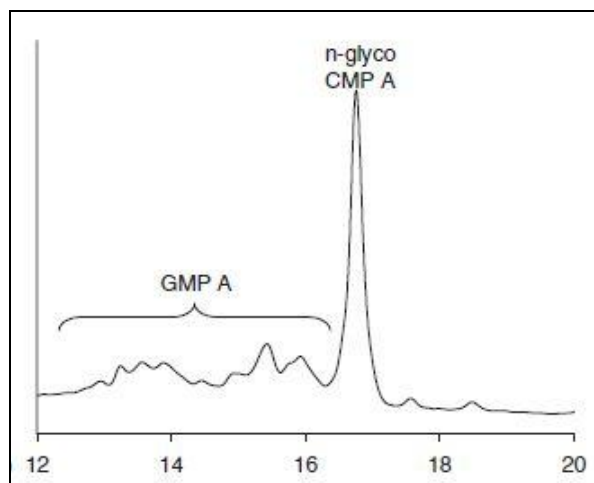


FIGURA 23 – AMPLIAÇÃO DE UM SEGMENTO DE CROMATOGRAFIA DE SORO DE LEITE DE VACA COMUM MOSTRANDO OS MULTIPLOS PICOS DE CMP E O PICO DE CASOAMINOÁCIDO
 FONTE: THOMA *et al.*(2006).

NOTA: tempo de retenção de 12 a 14 min picos de CMP glicosilado e de 16 a 18 min. o pico de CMP não glicosilado.

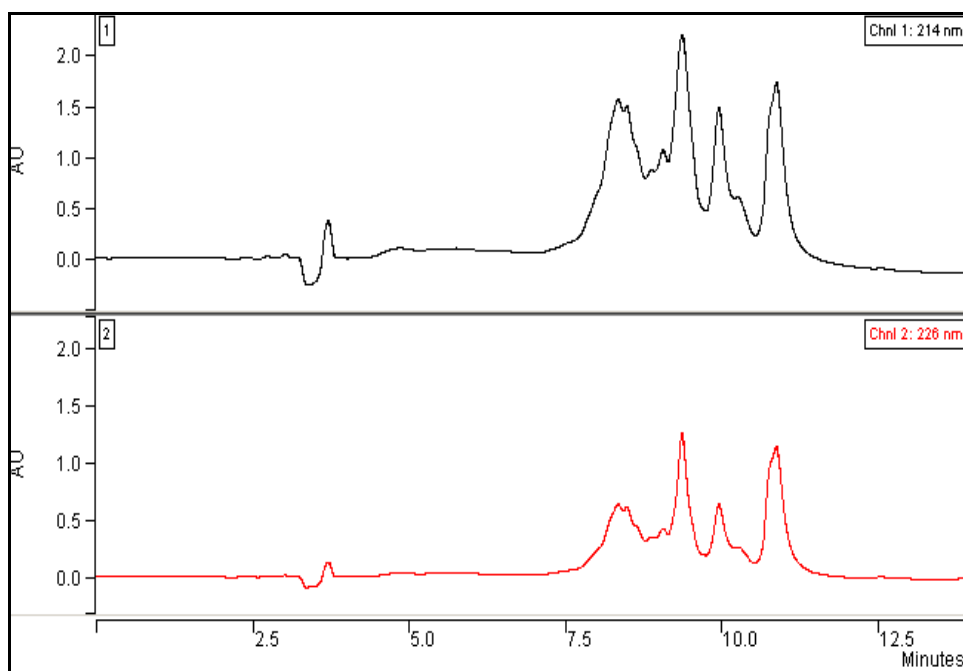


FIGURA 24 – CROMATOGRAFIA DO CMP COMERCIAL (LACPRODAN – CGMP-10 – ARLA).
 FONTE: TULLIO (2007).

Comparando o cromatograma da fração F2 (FIGURA 22) com o correspondente CMP comercial (FIGURA 24), estudado por TULLIO (2007) é possível notar um mesmo perfil de picos em igual tempo de retenção. Sendo que, ambos os estudos possuem o mesmo parâmetro metodológico, proposta por THOMA, KRAUSE e KULOZIK (2006). Diferente do CMP padrão (FIGURA 21), o

CMP comercial possui maior pico no tempo de retenção de 11 minutos, demonstrando perfil mais próximo do CMP isolado por cromatografia de troca-iônica (F2) e por ultrafiltração (frações R5R30, R30 e SPD), conforme mostra FIGURA 22 e FIGURA 27.

Nas frações subseqüentes da cromatografia de troca iônica F3 e F4, que correspondem a eluições com o mesmo volume de cloreto de sódio 1M, praticamente não é observada a presença significativa dos peptídeos de interesse glicosilados ou não glicosilados no intervalo do tempo de retenção entre 8 e 12 minutos, conforme demonstra a FIGURA 25 A e B. Pode-se afirmar que, praticamente, todo o CMP foi liberado já na primeira eluição com cloreto de sódio (fração F2).

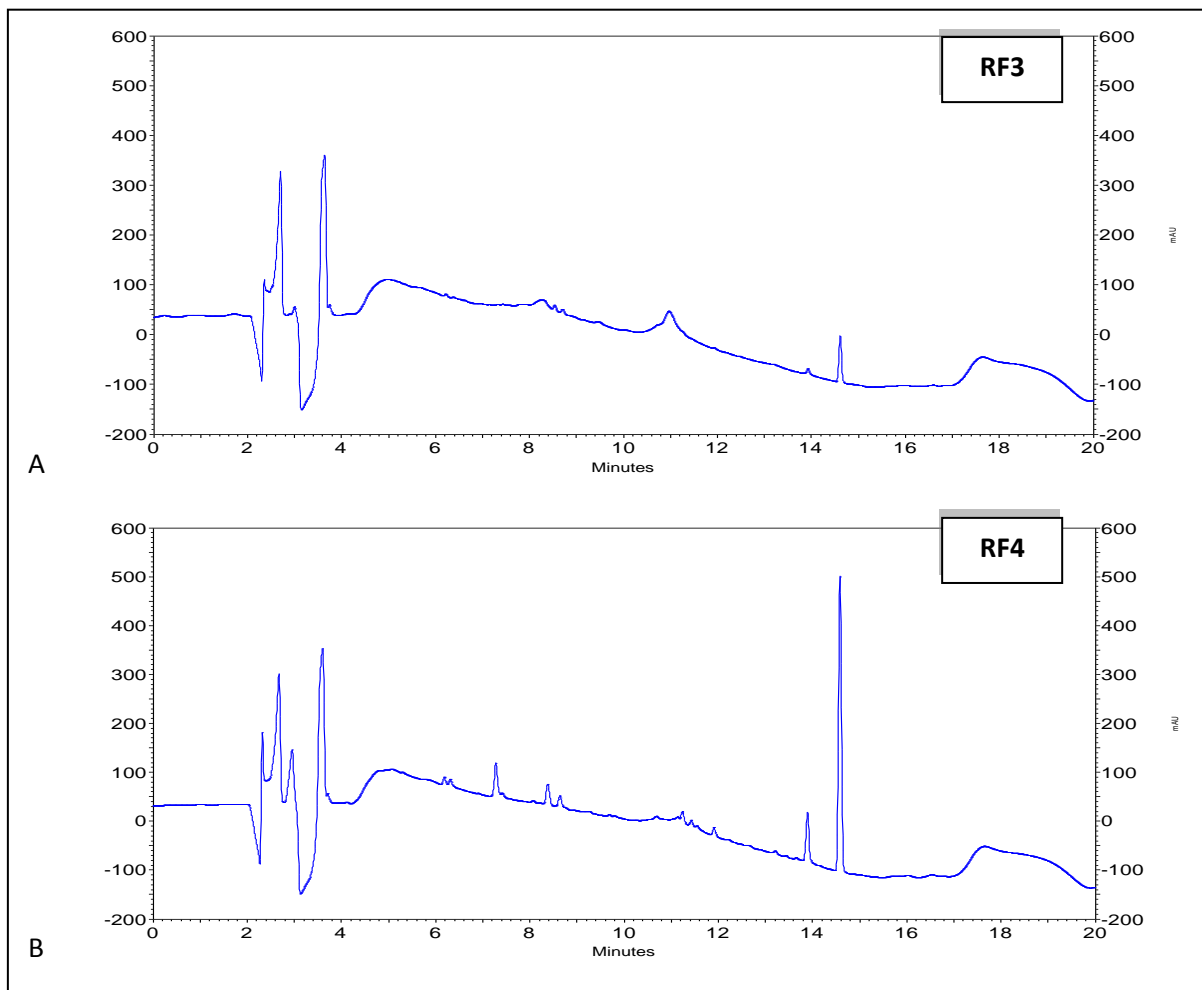


FIGURA 25 - CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES F3 (A) E F4 (B) OBTIDAS PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA, DILUÍDAS A 10mg/mL E INJEÇÃO DE 30 μ L

Com relação às amostras de CMP obtidas por ultrafiltração a fração que apresentou os maiores picos na região de migração dos CMP foi a fração R5R30, cujo cromatograma é mostrado na FIGURA 26. Pode-se observar que o perfil de picos no cromatograma de ultrafiltração é semelhante ao correspondente da amostra F2 obtida pelo sistema de cromatografia de troca-iônica. Nota-se a presença dos múltiplos picos de CMP nos tempos correspondentes aos obtidos no cromatograma do padrão de CMP e mais o pico majoritário na região dos 10 a 12 minutos, demonstrado por THOMA *et al.*(2006).

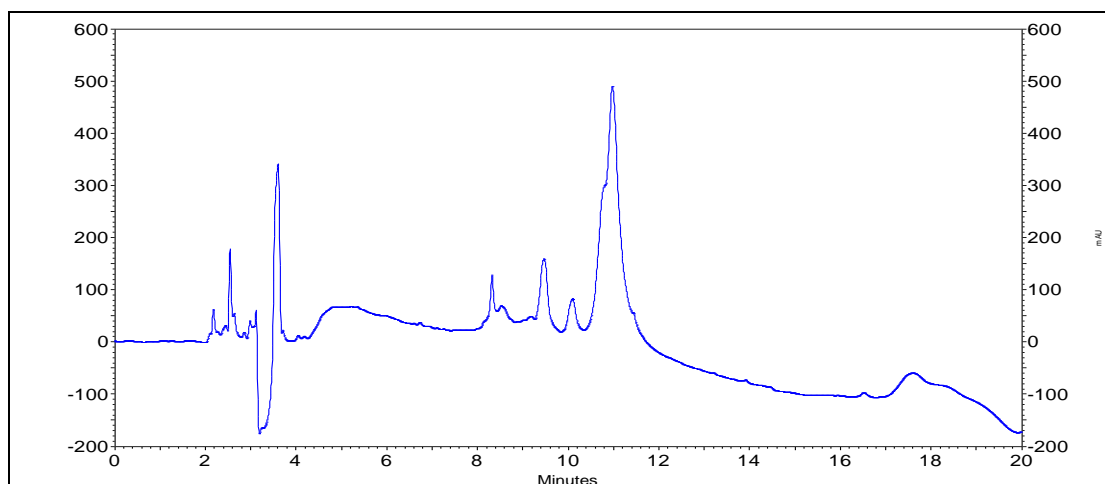


FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO R5R30 OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO DILUÍDAS A 10 mg/mL E INJEÇÃO DE 30 μ L

Outras três frações R30 (retentado da membrana de 30 kDa), R5R30 (retentado da membrana de 5 kDa a partir do retentado de 30 kDa) e SPD (retentado da membrana de 30 kDa com secagem em *spray dryer*) também apresentaram um perfil de picos similar aos obtidos na região de migração da CMP, conforme mostra a FIGURA 27, apenas em quantidades visualmente inferiores. Este perfil semelhante obtido nas três frações demonstra que o processo de ultrafiltração foi menos seletivo do que no método de cromatografia de troca iônica. Portanto, explica-se o motivo significativo do maior rendimento obtido na fração F2 da cromatografia de troca iônica.

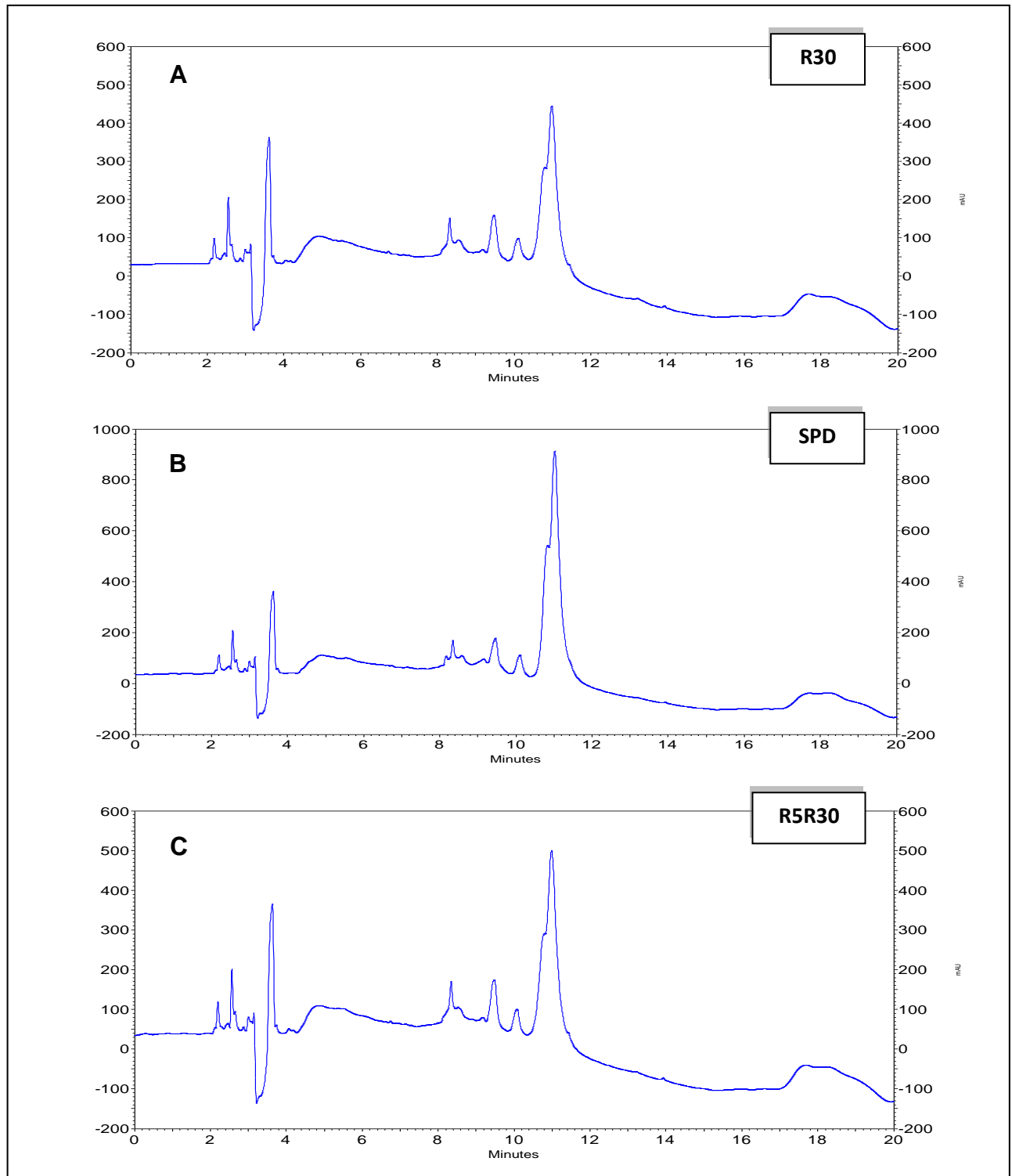


FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DAS FRAÇÕES R30 (A), SPD (B) E R5R30 (C) OBTIDAS PELO MÉTODO DE ULTRAFILTRAÇÃO

NOTAS: Diluídas a 10 mg/mL e injeção de 30 µl; R5R30 – retentado de 5 kDa do retentado de 30 kDa; SPD – ultrafiltração com secagem em spray dryer; R30 – retentado de 30 kDa.

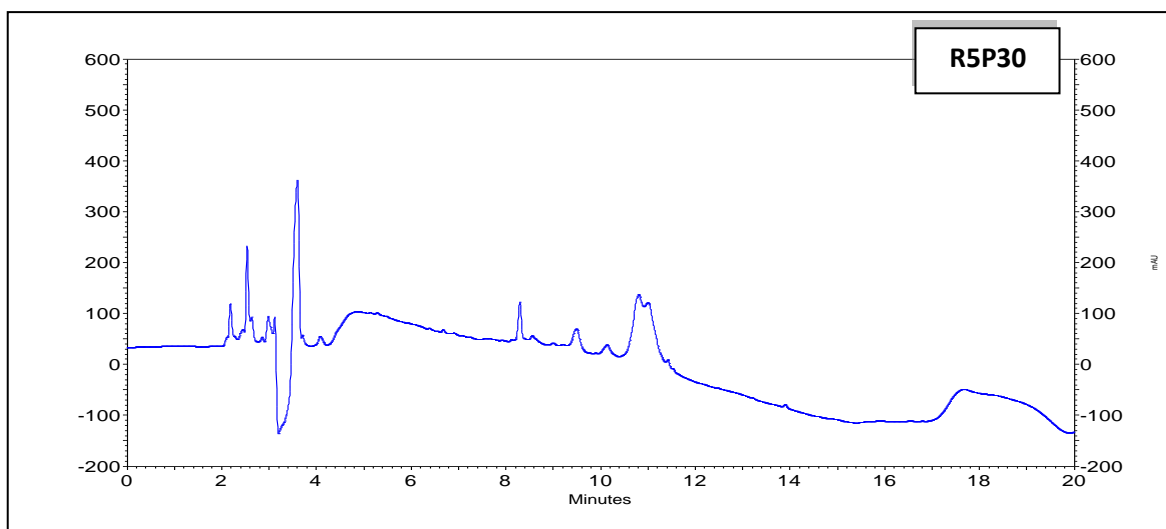


FIGURA 28 – CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO R5P30
NOTA: diluída a 10mg/mL e injeção de 30 μ L.

Conforme TAYLOR e WOONTON (2009), o tempo de retenção e contagem de área total dos picos dos padrões do CMP é entre 4 e 8 min., da peptona proteose entre 8 e 10 min., da α -lactalbumina 10,5 e 11,5 min. e β -lactoglobulina é de 12,5 a 13,5 min.

A FIGURA 29 mostra o cromatograma com mesma técnica utilizada nos outros cromatogramas, detecção em 214 nm com amostra diluída a 10 mg/mL e injeção de 30 μ L para posterior comparação. Pode-se observar que a linha azul que retrata o WPI e a linha verde que retrata o soro, possui o maior pico no tempo de retenção de 11 a 12 min. Como se sabe, o teor de proteína mais relevante da composição do WPI e do soro é a β -lactoglobulina com cerca de 16 a 18%. Porém, esta proteína é menos estável ao tratamento térmico e possui peso molecular maior que a α -lactalbumina e mais distante do peso molecular do CMP. No isolamento por ultrafiltração, inicialmente, foi feito tratamento térmico para que as proteínas termolábeis desnaturassem e precipitassem, sendo descartadas do processo. Uma possibilidade, devido ao tempo de retenção (11 a 12 min.) do pico nas FIGURAS 22, 26, 27, é que este seja a α -lactalbumina. Na FIGURA 22, a concentração desse pico é ainda maior. Pode-se explicar isto, devido este processo por cromatografia de troca-iônica, não ter tido a etapa anteriormente de tratado térmico.

Alguns autores relatam que a ultrafiltração não é capaz de separar as proteínas do soro de leite eficientemente, uma vez que a-la e b-Ig apresentam massa molar e pontos isoelétricos semelhantes (ALCÂNTARA, 2011).

Na FIGURA 29, é mais provável que esse pico seja da a-lactalbumina devido ao seu tempo de retenção. A linha vermelha representa o padrão de CMP, que possui vários picos no tempo de retenção de 8 a 10 minutos. No entanto, no tempo de 10 a 11 minutos não possui pico relevante.

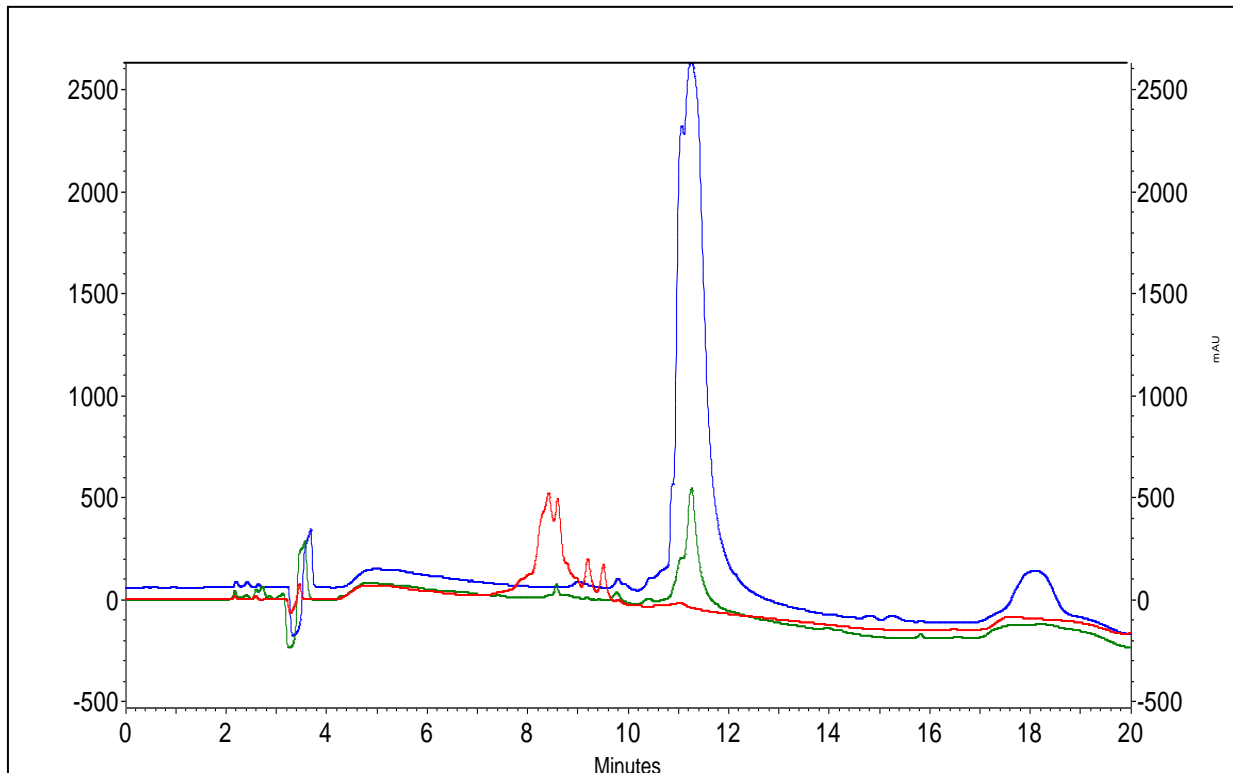


FIGURA 29 - CROMATOGRAMA DO WPI, PADRÃO DE CMP E SORO

NOTA: linha azul (WPI), vermelho (padrão de CMP) e verde (Soro). 214 nm, diluída a 10mg/mL e injeção de 30 μ L.

4.5 GEL DE PROTEÍNA

Inicialmente foram feitas dispersões de proteína somente utilizando o WPI como componente protéico, como demonstrado na TABELA 12. Nota-se que ao aumentar a temperatura de tratamento das dispersões de 60°C para 70°C o tempo de formação do gel diminuiu de 30 min. para 15 min., para as amostras 6 e 7. Tal temperatura foi utilizada para geleificação das demais amostras devido à redução no tempo de processamento das mesmas. Posteriormente, o objetivo foi estabelecer uma concentração alta de proteína em um tratamento na temperatura de 70°C, sem deixar que o gel se tornasse muito rígido, ou seja, o início da formação do gel, quando a dispersão de proteína muda de fase para gel.

A redução do tempo de formação de gel com o aumento da temperatura pode ter origem devido ao desdobramento da estrutura compacta globular do WPI à temperatura mais elevada e devido ao aumento da taxa de agregação por causa do aumento do número de colisões em temperaturas mais altas (OTTE *et al.*, 1999).

TABELA 12 – VARIÁVEIS DO TRATAMENTO DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA COMPOSTA DE WPI

Amostra	Concentração (p/p)	Composição	Tempo (min.)	Temperatura (°C)
1	20%	WPI	30	70
2	20%	WPI	20	70
3	20%	WPI	15	70
4	30%	WPI	30	70
5	30%	WPI	20	70
6	30%	WPI	15	70
7	30%	WPI	30	60

NOTA: WPI – isolado protéico de soro de leite.

Num segundo momento, foram estudados géis de composição mista com WPI e o isolado de CMP feito por ultrafiltração e troca-iônica, como é apresentado na TABELA 13. O interesse foi aumentar a concentração de proteína de tratamento com temperatura de 70°C, no ponto de mudança de fase de sol para gel, mas, sem promover a formação de um gel muito rígido.

TABELA 13 – VARIÁVEIS DO TRATAMENTO NO TEMPO DE 30 MINUTOS DA DISPERSÃO DE PROTEÍNA COMPOSTA DE ISOLADO DE CMP E WPI

Amostra	Concentração (p/p)	Composição	Cor	Característica física	Temperatura (°C)
8	30	WPI/F2	branca fosca	Gel fraco	70
A	30	R5R30	amarela transparente	Líquido precipitado	70
9	30	WPI/R5R30	branca fosca.	Sinérese	80
10	45(30/15)	WPI/R5R30	amarela fosca	Pastoso	70
11	50(30/20)	WPI/R5R30	amarela fosca	Gel	70
B	30	SPD	marrom claro-transparente	Líquido precipit.	70
12	45(30/15)	WPI/SPD	amarela fosca	Gel	75
13	50(30/20)	WPI/SPD	amarela fosca	Gel	75
C	30	CMP	amarela transparente	Líquido precipitado	70
14	50(30/20)	WPI/CMP	amarela fosca	Gel fraco	70
15	45(30/15)	WPI/CMP	amarela fosca	Pastoso	70
16	50(30/20)	WPI/R30		Gel	70

Como é apresentado na TABELA 12 as amostras A , B e C não formaram gel com o tratamento de 30 minutos em temperatura de 70°C. As amostras A e C ficaram líquidas e de coloração amarelada translúcida e a amostra B líquida de coloração marrom clara translúcida. Todos os géis formados ficaram com coloração fosca e amarelada, com exceção das amostras 15 e 16 que apresentaram coloração fosca e esbranquiçada. Estas amostras 15 e 16, também apresentaram sinérese e aspecto fraco de gel.

A FIGURA 30 ilustra os aspectos dos géis de proteína produzido com WPI e CMP. O gel 1 possui concentração de 20% de WPI, cor amarelo-acastanhada e translúcido. O gel 2 com 30% de WPI, possui cor acastanhada e translúcida. O gel 3 com 50% sendo 30% de WPI e 20% de R5R30 , possui cor acastanhada mais forte e translúcido. O gel 4 possui concentração de proteínas de 30% sendo 15% de WPI e 15% de F2, com coloração branca, opaco e aspecto macio. É notório que, das amostras de 1 a 3, quanto maior a concentração de proteína mais forte fica a coloração. Na amostra 4 o gel tem aspecto mais opaco e coloração mais forte que as demais além de apresentar sinérese. A cor branca foi ocasionada, provavelmente, pelo F2 possuir resíduo de cloreto de sódio na sua composição. A solução F2 tem origem da cromatografia de troca-iônica, no qual o CMP adsorvido

na coluna foi eluído com solução de cloreto de sódio 1 mol.L⁻¹. Após a separação por cromatografia de troca iônica foi feito ultrafiltração com membrana de 5 kDa para a eliminação desse cloreto de sódio, porém pode ficar algum resíduo.

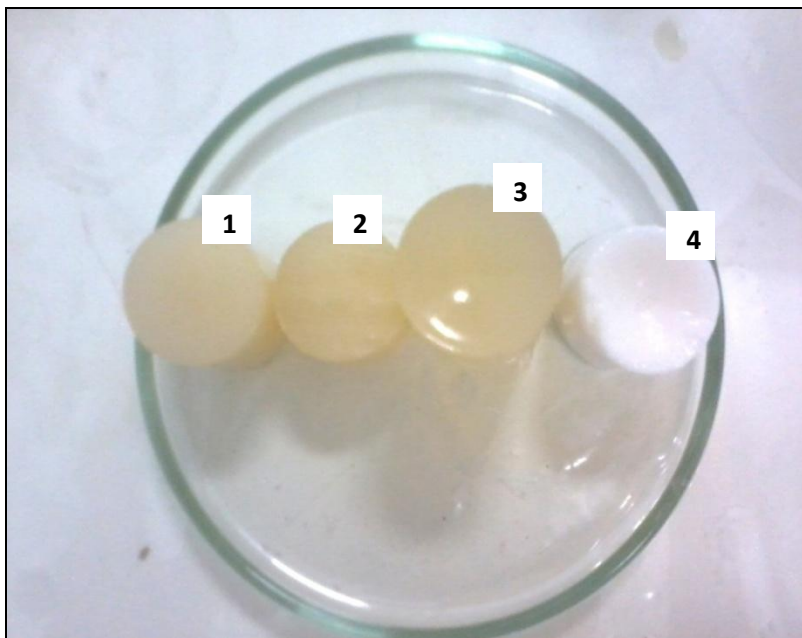


FIGURA 30 – ASPECTO DOS GEIS DE PROTEÍNA

NOTA: (1) 20% DE WPI, (2) 30% DE WPI, (3) 50% DE WPI/R5R30, (4) 30% WPI/F2.

Quando o pH da solução de 9% de WPI, não tratada termicamente, foi ajustado a valores menores que 6,2, a solução apresentou um aspecto leitoso e opaco e quanto menor o pH mais opaco se tornava a dispersão, mas não ocorreu formação de gel mesmo em pH 5. Isto indica a formação de agregados por indução ácida devido ao abaixamento das forças repulsivas eletrostáticas com a diminuição do pH. Quando o pH de solução de WPI desnaturado foi ajustado para 6 ou abaixo, ocorreu geleificação por indução ácida quase que instantaneamente. A natureza translúcida dos géis de WPI desnaturados, os agregados de proteínas desnaturadas devem apresentar um ordenamento, para formar um gel de fina cadeia quando o pH foi reduzido (OTTE *et al.*, 1999). Sabendo os pontos isoelétricos das proteínas, pode-se interferir na formação de agregados e consequentemente na formação de gel, somente alterando o pH. Os pontos isoelétricos das proteínas do soro são: 5,2 para b-lactoglobulina; 4,6 para a-lactalbumina; menos que 3,8 para o caseinomacropeptídeo; 5,5-8,3 para imunoglobulinas; 4,7-4,9 para albumina do soro bovino; 9 para lactoferrina e 9,5 para lactoperoxidase. Nesse estudo, também foi

aumentado o pH para 8,5 de uma solução com 30% de WPI e posteriormente feito tratamento térmico até a formação de gel, que ocorreu a temperatura de 60°C por 6 min. Com isto, foi verificado que a temperatura e o tempo de tratamento diminuiu consideravelmente em relação ao tratamento convencional utilizado das soluções com pH 7,0. Já em pH 10,3, gelificou sem tratamento térmico.

4.6 ANÁLISES REOLÓGICAS DOS GÉIS

As análises foram realizadas com finalidade de estudar a viscoelasticidade de um sistema complexo, ou seja, estudar o efeito das diferentes concentrações de WPI e CMP na formação do gel, assim como a interação entre eles. Também foram estudados os efeitos reológicos em relação a variáveis de temperatura e tempo para obtenção do gel.

4.6.1 Análises Dinâmicas Oscilatórias

As análises oscilatórias são sensíveis à composição química e à estrutura física das amostras. Tais análises foram realizadas com intenção de conhecer as propriedades viscoelásticas e estruturais das amostras de géis.

Inicialmente foi realizada uma varredura de tensão, fixando-se frequências de 0,05Hz e 10 Hz para determinar a região viscoelástica linear das amostras (RVL). Na RVL os valores de G' ou G'' permanecem constantes com o aumento da amplitude da tensão aplicada, a uma dada frequência constante. De acordo com KUTSCHMANN (2003), a maior estabilidade é esperada para amostras que possuem a região viscoelástica linear mais ampla e com maiores valores do módulo elástico G' . Por esse motivo, entre as amostras que possuem maior estabilidade viscoelástica, a de número 4 é de extremo destaque (ver TABELA 14, 15). No entanto, esta possui 30% de concentração exclusivamente de WPI, além do maior tempo (30 min.) e temperatura (70°C) utilizada para o tratamento.

Entre as amostras com o CMP isolado, as que possuem maior estabilidade viscoelástica, em relação ao maior valor do módulo elástico, são as amostras 9, 12 e 13. Tais amostras precisaram de um aumento de temperatura para formar gel (80 e 75°C). No quesito de amplitude da linearidade, possuem maior estabilidade as amostras 13 e 14, sendo que a diferença de amplitude entre as amostras é mínima. Comparando as amostras 12 e 13, que possuem diferença somente de 5% na concentração do mesmo isolado de CMP, a amostra 12 possui maior valor de G' . Por esse motivo, pode-se dizer que, entre as duas amostras, a de número 12 possui estrutura de gel mais forte. Essas amostras possuem concentração de 50% de proteína sendo 30% de WPI e 20% da fração isolada de CMP por ultrafiltração com secagem por *spray dryer* (amostra 13) e concentração de 45% de proteína sendo 30% de WPI e 15% da mesma fração isolada (amostra 12). Isto significa que o aumento da porcentagem do isolado de CMP na composição do produto, tornou a estrutura do gel mais fraca.

VEITH e REYNOLDS (2004), para desenvolver um processo para a produção de WPC com elevada força de gel, analisaram dez amostras de WPC comercialmente disponíveis com diferentes propriedades funcionais. A força de gel das dez amostras de WPC foi associada a vários fatores, incluindo pH, força iônica, concentração de proteína, solubilidade da proteína e composição (ROJAS *et al.*, 1997). A partir dos resultados obtidos destas análises, foi desenvolvido um processo, que envolveu UF e diafiltração (DF) de soro de queijo, a pH 2,5 com uma membrana “cut-off” de 30 kDa a 15°C para remover os minerais, lactose e CMP. O WPC produzido exibiu uma força de gel e retenção de água superior aos WPCs comerciais.

O outro fator importante que afeta a força do gel é a presença da b-lactoglobulina, a proteína mais abundante de soro de leite e a mais importante para a gelificação (MULVIHILL e KINSELLA, 1987). Já a presença de CMP no WPC é prejudicial à força de gel e à retenção de água. O CMP é um peptídeo glicosilado e fosforilado com propriedades bastante diferentes em comparação com as proteínas globulares, tais como β -lg, envolvido na formação de gel. O efeito prejudicial do CMP é devido a sua não incorporação na rede de gel de proteína e sua competição por ligação de água.

A TABELA 14 mostra os valores de G' na RVL obtidos na varredura de tensão na frequência de 0,05 Hz e 10 Hz.

TABELA 14 – VALORES DO MÓDULO ELÁSTICO (G') NA RVL

Amostra	Frequência 0,05 Hz	Frequência 10 Hz
1	5179	7602
4	35940	43140
2	8031	7602
5	35290	17300
6	13890	15510
3	1441	2276
7	3465	4768
8	446,7	924
9	59950	103700
15	46420	8298
10	51790	4160
12	16380	48140
23	14680	20400
11	5572	15510
14	2994	4314
16	9467	5995

Na TABELA 15 são expostos os valores dos intervalos da linearidade de tensão das amostras. O maior valor de tensão, nas frequências estabelecidas, observado é da amostra 4. Pode-se comparar a amostra 1 com a 4 por possuir variação somente nas suas concentrações (%). A diferença de valores de tensão da amostra 1 comparada com a amostra 4 é bem expressiva, a qual se justifica pela diferença de concentração do WPI (amostra 1= 20% e amostra 4 = 30%) , como pode ser observado na TABELA 11. O menor valor de tensão é caracterizada pela amostra 8 e seguidamente, pela amostra 3. A amostra 8 possui 30% de proteína sendo utilizado 15% de WPI e 15% da fração 2 (F2). Seu aspecto foi um gel fraco de cor branca. A amostra 3 é composta por 20% de WPI e teve um tratamento a 70°C por 15 minutos. Se compararmos com as amostras 1 e 2, de mesma formulação e somente com tempo de tratamento diferentes (amostra 1 = 30 minutos; amostra 2 =

20 minutos e amostra 3 = 15 minutos) , a linearidade do intervalo da tensão é muito maior , assim como seus valores nas amostras 1 e 2, do que na amostra 3. Isto mostra que quanto mais tempo a solução é exposta ao tratamento térmico, maior a desnaturação das proteínas e, conseqüentemente, maior a força do gel. FERRY (1948) sugeriu que o processo de geleificação envolve duas fases. Ocorre uma desnaturação inicial ou desdobramento da proteína seguido por agregação subsequente. A ligação cruzada dos agregados forma uma rede homogênea interligada de moléculas de proteína altamente solvatadas em uma matriz 3D com interstícios preenchidos por solução aquosa (VEITH e REYNOLDS, 2004).

A tensão crítica σ_c indica a energia mínima necessária para romper a estrutura interna do sistema e pode ser observada no ponto onde o ângulo de fase (δ) deixa de ser constante, ou seja, sai da RVL. Ao exceder cada vez mais a σ_c , o caráter viscoso da amostra aumenta. Na região viscoelástica linear todas as amostras apresentam caráter de sólido viscoelástico $\delta < 45^\circ$. Assim, quanto maior o valor da σ_c maior a estabilidade do sistema.

TABELA 15 – LINEARIDADE DE TENSÃO ENCONTRADA NA FREQUÊNCIA 0,05 E 10 Hz

Amostra	Frequência 0,05 Hz	Frequência 10 Hz
1	3 – 50 Pa	3 – 50 Pa
4	200 - 1000 Pa	100-1000 Pa
2	10 – 50 Pa	1 – 50 Pa
5	30 – 50 Pa	1 – 50 Pa
6	20 – 50 Pa	30 – 50 Pa
3	0,30 – 1 Pa	1 – 10 Pa
7	2 – 9 Pa	1 – 50 Pa
8	0,1 – 1 Pa	0,2 – 5 Pa
9	20 – 50 Pa	5 – 50 Pa
15	30 – 50 Pa	3 – 50 Pa
10	20 – 50 Pa	1 – 50 Pa
12	1 – 50 Pa	5 – 50 Pa
13	2 – 50 Pa	1 – 50 Pa
11	3 – 50 Pa	2 – 50 Pa
14	2 – 50 Pa	1 – 50 Pa
16	10 – 50 Pa	1 – 50 Pa

A partir da varredura de tensão em frequências de 0,05 Hz e 10,00 Hz, a tensão escolhida foi, dependendo da amostra, de 1 a 50 Pa para análise de varredura de frequência. Ou seja, as tensões utilizadas nas varreduras de frequência (0,05 a 10 Hz) são referentes à RVL determinada. Nesta tensão a estrutura do gel não é destruída por motivo de permanecer na RVL.

TABELA 16 – VALORES DE MODULO DE CISALHAMENTO DE ARMAZENAMENTO OU ELASTICO (G'), MODULO DE CISALHAMENTO DE PERDA OU VISCOSO (G'') , TANGENTE (δ) E VISCOSIDADE DINÂMICA COMPLEXA (η^*) NA FREQUÊNCIA DE 1 Hz

Amostra	G' [Pa]	G'' [Pa]	η^* [mPas]	Composição	TANGENTE (δ)
1	12260	1363	1964000	WPI	0,111
4	19030	2860	3063000		0,150
2	6924	763,8	1109000		0,110
5	1889	252,4	303300		0,134
6	2060	271,6	330700		0,132
3	290,8	34,34	46600		0,118
7	450,7	59,73	72360		0,133
8	62,42	15,87	10250	WPI/CMP	0,254
9	3887	654,4	627300		0,168
15	804,2	172,2	130900		0,214
10	700,5	156,0	114200		0,223
12	3706	604,5	597700		0,163
13	1824	328,1	294900		0,180
11	1909	391,0	310100		0,205
14	230,8	47,89	37510		0,207
16	458,0	110,8	74990		0,242

NOTAS: Ver apêndice.

Nas amostras 1, 2 e 3, que possuem composição de 20% de WPI, estão em ordem decrescente em relação a viscosidade dinâmica complexa (η^*) assim como em relação a variável tempo do tratamento (30, 20 e 15 min.) respectivamente. Por esse motivo é notável que existe relação entre o tempo de tratamento para formação do gel e da sua viscosidade dinâmica complexa (η^*). O mesmo ocorre com as amostras 4, 5, 6, 7 que apresentam composição de 30% de WPI. Porém a η^* da amostra 6 é um pouco maior que a amostra 5. A partir disso, pode-se dizer que não ocorre grande interferência entre tempo de 15 e 20 minutos de tratamento na η^* . O mesmo não ocorre com relação à concentração de 20% de WPI.

Conforme a TABELA 16 todas as amostras possuem valores do módulo elástico (G') maior que o módulo viscoso (G'') em toda a faixa de frequência, ou seja, se comportam como um sistema viscoelástico na forma de gel. Este comportamento de G' maior que G'' pode ser atribuído à ligação cruzada, formações por ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas (CHEN *et al.*, 2000).

Solução diluída, solução concentrada e gel apresentam comportamentos distintos quando submetidos a uma varredura de frequência. Na solução diluída, G'' é muito maior que G' sob toda a faixa de frequência e se aproximam um do outro em altos valores de frequência. As curvas de G'' e G' se interceptam no meio da faixa de frequência para soluções concentradas, que representa evidência de um comportamento mais próximo de um sólido em altas frequências. No caso do gel, G' é significativamente maior que G'' através de toda a faixa de frequência, apresentando um predomínio do caráter sólido. Este comportamento reflete a existência de uma rede tridimensional. Contudo, percebe-se que os módulos são fortemente dependentes da frequência no caso de soluções diluídas e concentradas e praticamente independentes para o gel (STEFFE, 1996; ENDRESS *et al.*, 1996).

As amostras que possuem valores maiores do G' são as de número 1, 4, 9 e 12. As amostras 1 e 4 referem-se as com conteúdo de 20 e 30% de WPI com tratamento de 30 minutos a 70°C. Pode-se afirmar, então, que a força de rede do gel depende muito mais das variáveis do processo em que foi elaborado do que da concentração de proteína. A amostra 1 possui diferença de 10897 Pa entre os valores de G' e G'' e a amostra 4 possui essa diferença igual a 16170 Pa. Assim, o maior valor da diferença é da amostra de número 4, correspondendo a gel mais forte

que a amostra 1. Observa-se também que a viscosidade dinâmica complexa (η^*) da amostra 4 é maior que a amostra 1, reafirmando que a amostra 4 é um gel mais forte. O gel mais forte composto de WPI (amostra 4) possui as maiores variáveis de tratamento estipuladas. No entanto, modificando somente a variável temperatura, o gel modifica bastante a ponto de tornar a viscosidade dinâmica complexa (η^*) a menor entre todas as amostras (amostra 18).

As amostras 9 e 12 referem-se às composições de 30% (15/15) de WPI/R5R30 e 45% (30/15) de WPI/SD com tratamento de 30 minutos à 80°C e 75°C respectivamente. A amostra 9 possui diferença de 3232,6 Pa entre os valores de G' e G'' e a amostra 12 possui essa diferença igual a 3101,5 Pa. Assim, o maior valor da diferença é da amostra de número 9, correspondendo a gel mais forte que a amostra 12. Observa-se também que a viscosidade dinâmica complexa (η^*) da amostra 9 é maior que a amostra 12, reafirmando que a amostra 9 é um gel mais forte. O gel mais forte composto da mistura de WPI com o isolado de CMP (amostra 9) possui a maior variável de temperatura (80°C) e menor variável da composição (30%). No entanto, abaixando somente a variável temperatura, não ocorre formação de gel. Através desses dados pode-se notar que a variável temperatura, entre as variáveis referidas, é a que possui maior interferência na força da formação da rede de gel.

Se comparada a amostra 4 com a 8 e 9, as quais possuem as mesmas variáveis de tratamento (30 minutos à 70°C) e concentração (30%) com composições de WPI e WPI/F2, respectivamente, a de número 4 possui G' muito maior que a amostra 8, além da diferença entre G' e G'' também ser maior. Isso mostra que a modificação da proteína na composição para CMP alterou a força do gel para uma estrutura mais fraca. Mesmo comparando a amostra 4 com a 9, que possui mesmo tempo de tratamento porém com aumento de temperatura para 80°C e igual concentração com composição diferente de WPI/R5R30, a 9 possui menor G' e menor diferença gerando um gel ainda mais fraco. Ainda comparando a amostra 4 com as amostras 15, 10 e 12, que são enriquecidas com mais 15% das frações de CMP, R5R30 e SD, esta ainda apresenta mais força estrutural de gel.

No entanto, o módulo de armazenamento (G') é fortemente afetado pela concentração de sólidos solúveis, em estudo com géis de polissacarídeos, que

promove a redução de atividade de água. Assim como, o aumento da concentração eficaz de pectina, também pode contribuir com esse aumento de G' (LOFGREN; HERMANSSON, 2007).

Aumentando a concentração de proteína aumenta o número de partículas de proteína que colidem e mais ligações cruzadas são formadas levando a uma taxa mais elevada tanto de geleificação, como uma maior força de gel final (OTTE *et al.*, 1999).

Pode-se relatar que a adição do CMP, ao contrário do comportamento de polissacarídeos e de outras proteínas, acarreta diminuição na força de rede do gel.

O espectro mecânico das amostras de géis é demonstrado no APÊNDICE. Para todas as amostras $G' > G''$ em toda a faixa de frequência e, sobretudo, ambos os módulos são paralelos com um pequeno aumento na inclinação em altas frequências. Segundo BRUMMER (2006) este espectro é característico de rede de gel e de emulsões com alta força estrutural interna.

A adição dos isolados de CMP diminuiu os valores dos módulos elásticos (G') e viscoso (G'') das amostras (ver APÊNDICE e TABELA 16). Devido a isso, ao aumentar a concentração de proteína (CMP) a rede de gel se torna mais fraca.

Outra característica de estrutura de gel forte é quando o G' é independente da frequência, conforme se pode notar nos espectros das amostras de 1 a 7 (ver APÊNDICE). Nas amostras de 8 a 16, que são compostas das misturas com os isolados de CMP, existe certa dependência com o aumento da frequência. Pode-se concluir, então, que o isolado do CMP atrapalha a formação da rede de gel.

Em estudo realizado por STEFFE (1996), foram utilizados os valores da tangente (δ), nomeada de tan delta, para caracterizar a força dos géis de amido. Sendo $\delta = G''/G'$ em função de uma frequência pré-determinada, esse valor de tangente foi considerado inversamente proporcional a força do gel. Na TABELA 16 são demonstrados os valores da tangente das amostras compostas por WPI e por mistura de WPI/CMP.

Nota-se que os maiores valores de δ correspondem aos géis de composição da mistura de WPI com as frações de CMP isolado. Isso mostra novamente que tais

amostras com o isolado de CMP são géis estruturalmente mais fracos. Analisando somente os géis de WPI, as amostras em ordem crescente do valor de δ são 2, 1, 3, 6, 7, 5, 4. A ordem crescente da δ referente às amostras com mistura WPI/CMP é 12, 9, 13, 11, 14, 15, 10, 16, 8. Como o gel de estrutura mais forte tem valores menores de tangente essas ordens equivalem à ordem decrescente da força estrutural do gel.

4.7 MICROESTRUTURA DO GEL

A geleificação de proteínas de soro de leite é o resultado de interações tanto físicas (eletrostática e hidrofóbica) quanto químicas (dissulfeto) entre as moléculas de proteína constituintes. A desestabilização da dobragem terciária nativa das proteínas aumenta as suas interações para um nível que provoca a formação de uma rede estável e geleificação. Tal desestabilização pode ser induzida pela adição de produtos químicos, pressão hidrostática, aquecimento, arrefecimento e hidrólise parcial enzimática. Cada um destes processos induz parcial ou total desdobramento resultando em agregação de proteínas e formação de gel. Agregação de moléculas de proteína no pH neutro ocorre através de reações tiol dissulfeto levando a formação pontes S-S (HOFFMANN; VAN MIL, 1999). A formação de ligações intermoleculares e dissulfeto depende fortemente da conformação molecular de proteínas e de processamento, tais como aquecimento, o qual foi utilizada na elaboração desse trabalho. Com a desestabilização da estrutura terciária das proteínas, grupos de cisteína e cistina podem ser expostos ao solvente e se tornar quimicamente reativos.

4.7.1 Análise Ultraestrutural em Microscopia Eletrônica de Varredura dos Géis Formados a Partir da Polimerização das Proteínas (WPI/CMP) em Diferentes Concentrações

As FIGURAS 31, 32 e 33 referem-se à análise ultraestrutural dos géis enriquecidos com diferentes concentrações das proteínas: 30% de WPI (1), 50% sendo 30% WPI e 20% R5R30 (2) e 50% sendo 30% WPI e 20% R30 (3), com um período de polimerização de 30 min. em temperatura de 70°C, empregando-se a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As imagens 1(A), 2(B), 3(C), 4, 5, 6 evidenciam análises morfológica e ultraestrutural da superfície externas dos diferentes géis. Pode-se observar a arquitetura dos diferentes géis em menor magnitude (500X imagens panorâmicas) nas imagens 1, 2, 3. As imagens (A), (B), (C) evidenciam uma ampliação da superfície externa destes géis com maior magnificação (2.000X).

As imagens 4, 5, 6 (Figura 32) evidenciam análise ultraestrutural do padrão de polimerização externa destes géis com magnificação de 3.000X.

As imagens 7, 8, 9 (Figura 33) evidenciam análise ultraestrutural da arquitetura interna dos respectivos géis após fratura destes com a técnica de congelamento e quebra. Estas imagens apresentam o padrão de polimerização dos géis. Pode-se observar o arranjo tridimensional destes géis após enriquecimento com as específicas concentrações protéicas. As imagens destas eletromicrografias apresentam magnitude de 10.000X.

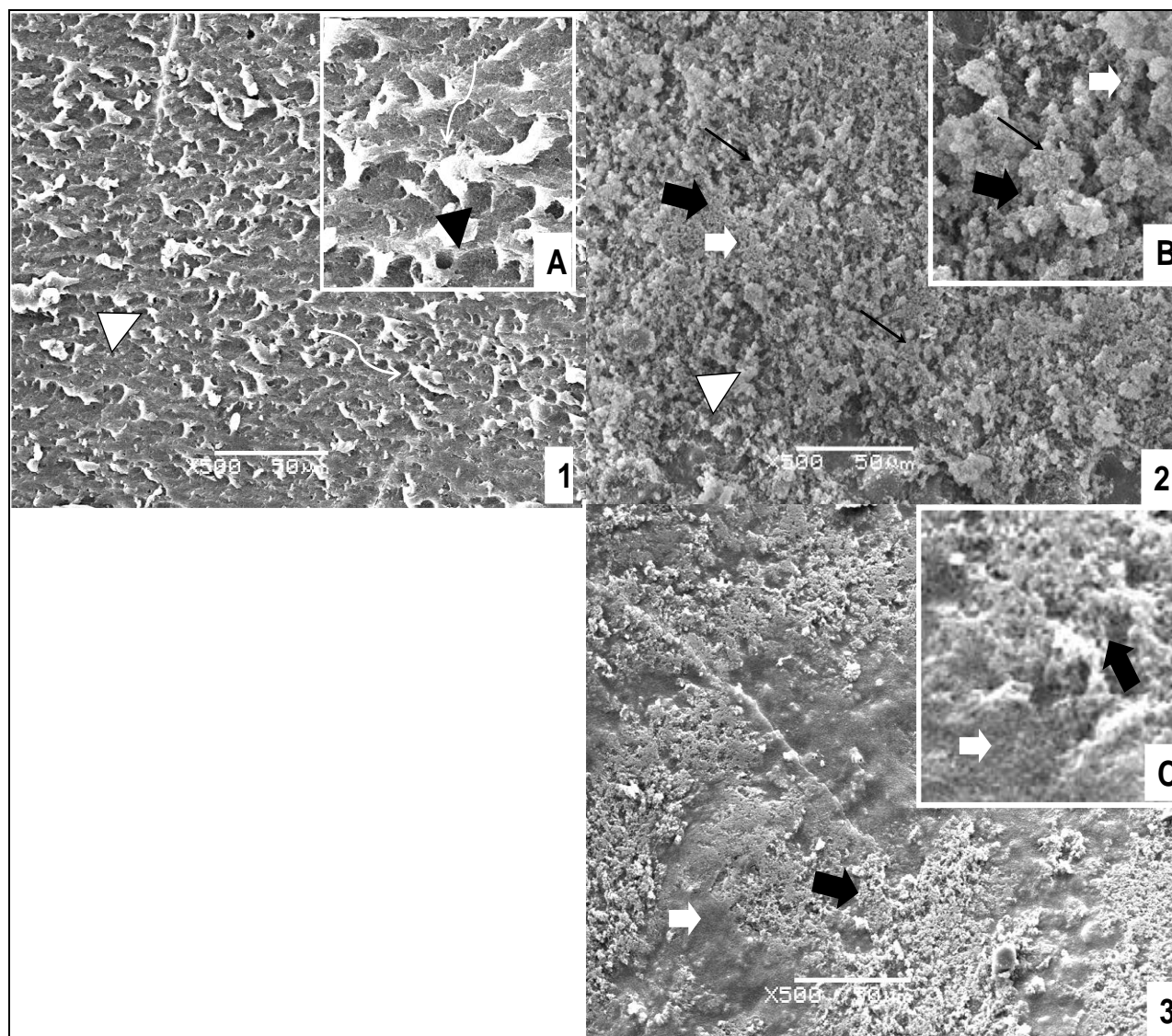


FIGURA 31 – MICROGRAFIA DOS GÉIS DE WPI E DAS FRAÇÕES DE CMP

NOTA: (1) 30% de WPI, (2) 50%: 30% de WPI e 20% de R5R30, (3) 50%: 30% de WPI e 20% de R30. Ver legenda da página 117.

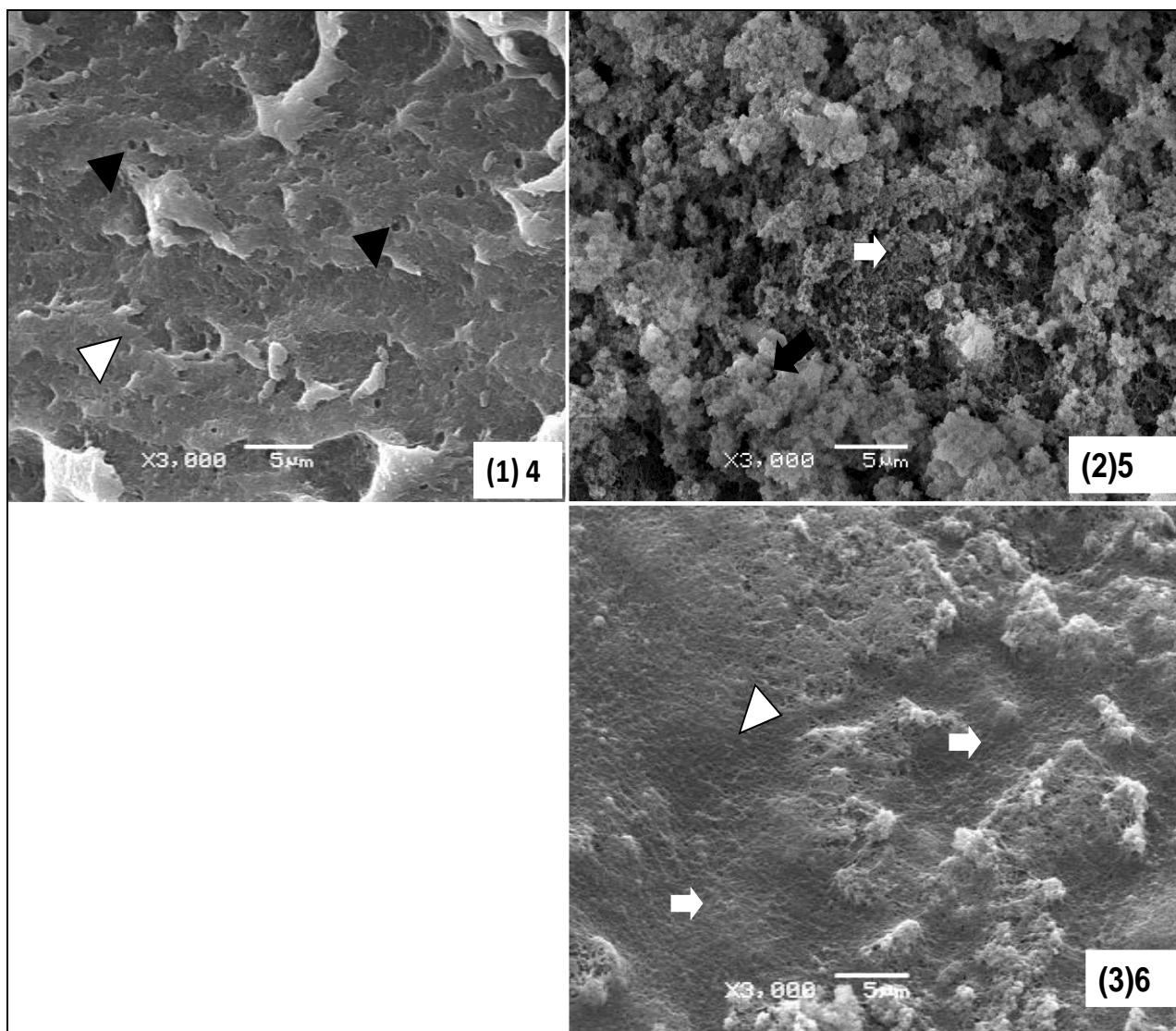


FIGURA 32 – IMAGENS 4, 5, 6 DOS GÉIS COM AUMENTO DE 3.000X

NOTA: (1) 30% de WPI, (2) 50%: 30% de WPI e 20% de R5R30, (3) 50%: 30% de WPI e 20% de R30. Ver legenda da página 117.

Pode-se observar nas imagens 1, 2 e 3 o padrão de polimerização da superfície externa dos diferentes géis através da Microscopia Eletrônica de Varredura. Observa-se na imagem panorâmica da imagem1 (FIGURA 31) que o gel com a concentração de 30% da proteína WPI, apresentou um padrão regular na morfologia e na distribuição de ultraestruturas em toda amplitude superficial deste. Observa-se estruturas lamelares (↗) distribuídas por sobre a superfície do gel. Observa-se na imagem A que este gel quando que analisado em maior magnitude apresenta algumas porosidades (▶) distribuídas de forma homogênea. Na análise

reológica, este é o gel (amostra 4 da reologia) de estrutura mais forte, entre os 3 apresentados, ou seja, com maior valor de módulo elástico (G').


De forma bastante diferente do padrão apresentado para o gel analisado na imagem 1, os géis 2 e 3 apresentam estruturas grosseiras com aglomerações de agregados.

O gel observado na imagem 1 apresenta por sobre a malha deste, deposição de material precipitado (➡) na forma de partículas agregadas por toda a superfície dos mesmos. A imagem 3 evidencia a arquitetura do gel formado a partir da concentração de 50% de proteína: 30% de WPI e 20% da fração de CMP (R30). Dentre todos os géis analisados 1, 2, esse gel pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura, evidencia um aspecto mais denso em sua superfície (⇔). Há por sobre o mesmo uma grande quantidade de material particulado depositado em grandes áreas da superfície deste gel na forma de placas de deposição (➡). Na reologia, este é o gel que apresenta menor valor de módulo elástico (G'), ou seja, gel de estrutura mais fraca entre os 3 géis analisados (amostra 16 da reologia).


Na imagem 2 da FIGURA 31 pode-se observar a superfície externa dos géis enriquecidos com a concentração de 50% de proteína: 30% de WPI e 20% da fração de CMP (R5R30). O gel observado na imagem 2 evidencia uma deposição maciça na quantidade de material particulado e aglomerado por toda a superfície do mesmo tornando o relevo deste gel muito irregular, a superfície externa deste gel é formado exclusivamente pela deposição e empilhamento de partículas agregadas (imagem B). É um gel de força estrutural intermediária em relação aos demais géis comparados (amostra 11 da reologia).

Observações gerais mostraram que o tamanho da partícula formando o gel e concentração de proteína podem afetar as propriedades da estrutura do gel. As misturas de diferentes proteínas mostraram várias microestruturas de rede densa e estruturas grosseiras com aglomerações de agregados (DONATO *et al.*, 2011).

4.7.2 Descrição dos Resultados Encontrados na Técnica de Varredura de Quebra (Malha interna dos géis)

Pode-se observar nas imagens das eletromicrografias 7, 8 e 9 onde se evidencia análise ultra-estrutural da arquitetura interna dos respectivos géis (\Leftrightarrow), após fratura destes com a técnica de congelamento e quebra, que o padrão de polimerização para os géis se fez na forma de estruturas globulares (). Estas estruturas globulares podem estar mais individualizadas em alguns géis ou mesmo fusionando-se umas com as outras sendo estas vesículas de menor ou de maior diâmetro como observado nas imagens 7 e 9.

Algumas micrografias do experimento de KUHN *et al.* (2011), que fez gel de WPI adicionado de sal, mostram maior descontinuidade e porosidade, que segundo a autora, retrata a baixa dureza e elasticidade destes géis. No experimento atual a imagem 9 também mostra uma certa descontinuidade e porosidade retratando uma baixa elasticidade ou seja, um gel de rede mais fraca como é igualmente confirmado pelo estudo reológico. O aumento da porosidade da estrutura pode ser atribuído a uma obstrução da interação proteína-proteína por algum outro elemento, e um aumento na repulsão eletrostática entre eles (KUHN *et al.*, 2011).

De forma interessante é possível observar um padrão diferente da malha interna do gel formada, frente aos demais géis analisados para a imagem 8. Esta malha evidencia um padrão menos denso que as demais com aspecto mais lábil, composto pela agregação de um padrão fibrilar acrescido de agregados vesiculares de menor diâmetro quando comparado com os demais géis. A malha deste gel da imagem 8 é de aspecto em MEV mais frouxa (.

Em estudo de LUCEY *et al.* (1997), gel feito a partir de leite com WPI não aquecido parecia ter uma rede tortuosa e com agrupados enquanto que gel à base de leite e WPI aquecido teve um tipo de rede ramificado. Como os géis estudados passaram por um tratamento térmico, a rede de gel tende para o aspecto ramificado.

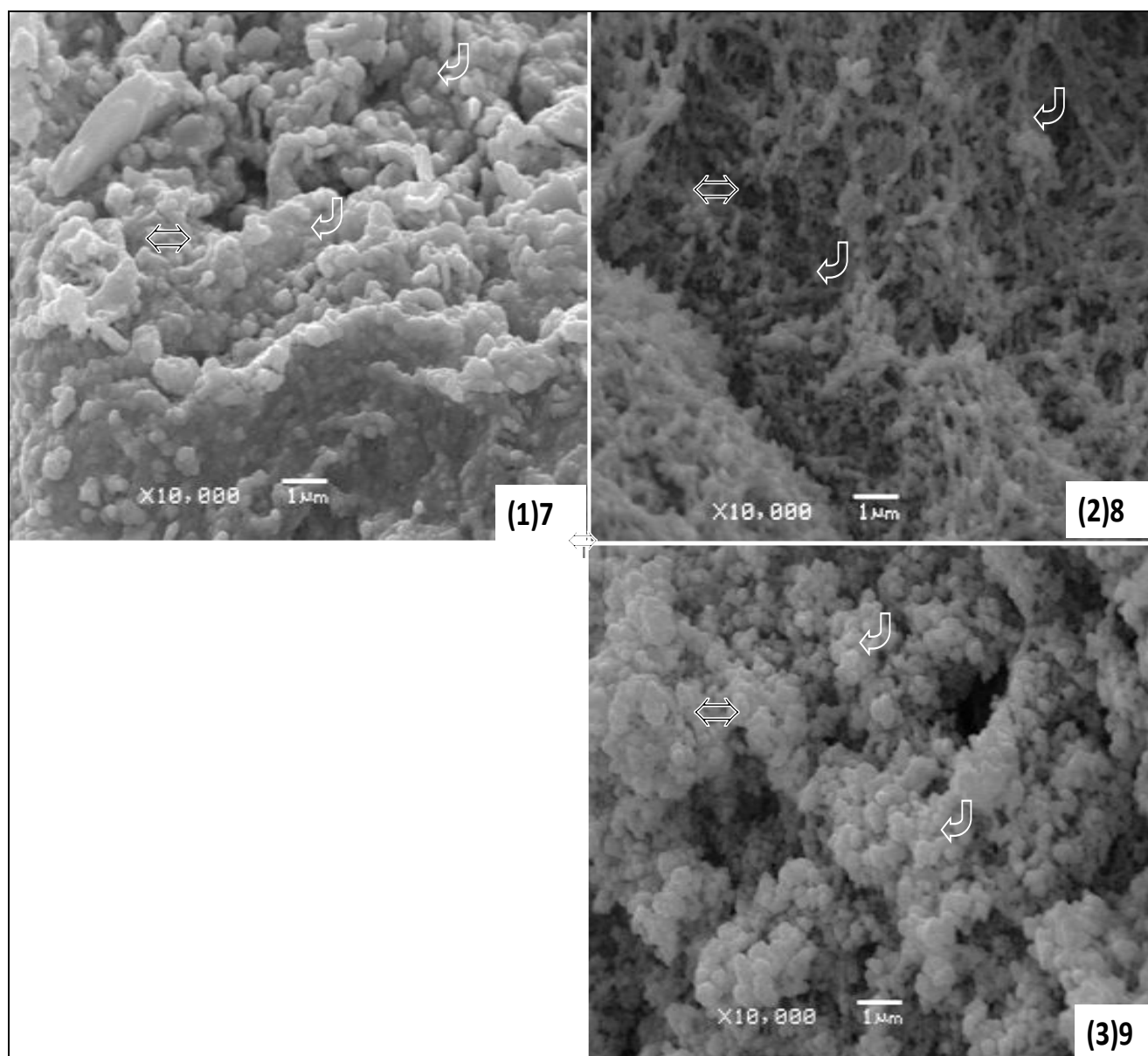












FIGURA 33 – IMAGENS 7, 8, 9 DOS GÉIS COM AUMENTO DE 10.000 X

NOTA: (1) 30% DE WPI, (2) 50%: 30% DE WPI E 20% DE R5R30, (3) 50%: 30% DE WPI E 20% DE R30. Ver legenda da página 117.

LEGENDA DAS IMAGENS: 1 a 9

Pranchas contendo as eletromicrografias obtidas no MEV

	Esta seta identifica o padrão estrutural da superfície externa do gel. Padrão do relevo dos géis;
	Esta seta identifica aspecto da polimerização do gel. Observa-se características estruturas na forma de precipitações interconctadas, fundidas umas com as outras. Depositadas de forma esparsas por sobre a superfície externa do gel ;
	Esta seta identifica gel com polimerização de padrão compacto, de aspecto denso, sem presença de poros ou perfurações;
	Esta seta identifica materiais particulados depositado em grande quantidade e em grandes áreas por sobre o gel,
	Esta cabeça de seta vazada identifica porosidades, perfurações que integram o gel;
	Esta seta identifica característica malha fibrilar, malha de aspecto aberta, gel soft;
	Esta seta identifica estruturas trabeculares, lamelares dispersas de forma regular por sobre a superfície externa do gel ;
	Esta seta identifica o padrão de polimerização interna do gel, a matriz interna dos geis. Pode-se observar uma matriz formada a partir de estruturas globulares. Estas podem estar em alguns geis mais individualizadas ou mesmo fusionando-se umas com as outras assumindo um padrão nodular em forma de cordões nodulares.
	Esta seta identifica que esta se observando a arquitetura e o padrão de polimerização interna do gel, após o gel ser congelado e sofrer fratura . Estamos observando a matriz interna do gel;
	Esta seta identifica o padrão de polimerização interna do gel, a matriz interna deste gel. Pode-se observar um padrão diferente frente aos demais geis analisados esta malha evidencia um padrão menos denso com aspecto mais lábil, composto pela agregação de um padrão fibrilar contendo agregados vesiculares de menor diâmetro. Uma malha de aspecto em MEV mais frouxa.

5 CONCLUSÃO

O isolamento do CMP por cromatografia de troca iônica é mais eficiente do que a ultrafiltração, apresentando respectivamente 100% de rendimento e 58%. Porém é ainda um método caro e demorado. A ultrafiltração é um método mais adequado para a indústria e a produção de grande escala de CMP.

As frações R5R30 e F2 mostraram perfil cromatográfico, obtido por CLAE-FR, de acordo com o padrão de CMP. A fração F2 apresentou maior concentração dos picos característicos de CMP.

O CMP apresenta características físicas e químicas complexas e ainda pouco conhecidas. É necessário mais estudos referentes ao melhoramento do processo para isolar o CMP.

O objetivo da elaboração do gel, através da otimização das variáveis, foi de conter maior porcentagem de proteína da mistura de WPI: CMP e proporcionar uma rede de menor força, para adaptar a características sensoriais do consumidor. Contudo, foi alcançado com o gel contendo 50% de proteína sendo 30% de WPI e 20% de CMP(R30), tratado termicamente com temperatura de 70°C a 30 min. Na sua eletromicrografia apresentou estruturas grosseiras com aglomerações de agregados e aspecto mais denso em sua superfície.

No estudo reológico, o gel com concentração de 30% de WPI, apresentou estrutura mais forte, com maior valor de módulo elástico (G'). Na MEV, observou-se um padrão regular na morfologia, estruturas lamelares distribuídas sobre a superfície e porosidades distribuídas de forma homogênea.

Pode-se relatar que a adição do CMP, ao contrário do comportamento de polissacarídeos e de outras proteínas, acarreta diminuição na força de rede do gel.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. M.; EL-SHIBINY, S.; BUCHEIM, W. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. **International Dairy Journal**, v.6, n.4, p.327-341, 1996.
- AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. Effect of high-hydrostatic pressure and temperature on rheological characteristics of glycomacropeptide. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1535-1540, 2003.
- ALCÂNTARA, L.A.P.; MINIM, L.A.; BONOMO, R.C.F. *et al.* Application of the response surface methodology for optimization of whey protein partitioning in PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography**, v.879, n.21, p. 1881-1885, 2011.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100, maio/jun. 2003.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. Farmacotécnica – **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. São Paulo: Premier, p.288-291, 2000.
- ANTUNES, A.E.; MOTTA, E.M.P.; ANTUNES, A.J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.23, p.183-189, dez. 2003.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas de soro de leite bovino**. Barueri; São Paulo: editora Manole, 2003.
- AOAC.ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th.ed.Gaithersburg. 2005. Revisão 2010.
- ARMSTRONG, C. E.; MACKINLAY, A.G.; HILL, R. J.; WAKE, R. G. The action of rennin on k-casein: the heterogeneity and origin of the soluble products. **Biochim. Biophys. Acta**, v.140, n.1, p.123-131, 1967.
- BARNES, H. A. The yield stress – a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 81, n. 1-2, p. 133-178, 1999.
- BELLAMY, W.; TAKASE, M.; YAMAUCHI, K. *et al.* Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **J. Appl. Bacteriol**, v.73, n.6, p.472-8, 1992.
- BIOLO, G.; WILLIAMS, B. D.; FLEMING, R. Y. D.; WOLFE, R. R. Insulin action on muscle protein kinetics and amino acid transport during recovery after resistance exercise. **Clinical Nutrition**, v.17, n.1, p.36, 1998.
- BOLMSTEDT, U. Viscosity & Rheology: Theoretical and practical considerations in liquid food processing. **New Food**, v.3, n.2, 2000.

BOUNOUS, G.; GOLD, P. The biological activity of unde natured dietary whey proteins: role of glutathione. **Clin Invest Med**, v.14, p.296-309, 1991.

BOURNE, M. C. **Food texture and viscosity**: concept and measurement. New York: Academic Press, p.324, 1982.

BRASEQ, Brasileira de Equipamentos Ltda. **Boletim Técnico Informativo Braseq**. Jarinu (SP), 2007.10 p.

BRITTEN, M. Heat treatments to improve functional properties of whey proteins. Whey, Brussels: **International Dairy Federation**, p.189-196, 1998.

BRODY, J. Biological activities of bovine glycomacropeptide. **Br. J. Nutr.** v.84, n.1, p. 39-46, 2000.

BROMLEY, E. H. C.; KREBS, M. R. H.; DONALD, A. M. Aggregation across the length scales in β -lactoglobulin. **Faraday Discussions**, v.128, p.13-27, 2005.

BROMLEY, E. H. C.; KREBS, M. R. H.; DONALD, A. M. Mechanisms of structure formation in particulate gels of β -lactoglobulin formed near the isoelectric point. **European Physical Journal E**, v.21, p.145-152, 2006.

BROOKFIELD ENGINEERING LABORATORIES; More solutions to sticky problems. 1994.

BRUMMER, R. **Rheology essentials of cosmetic and food emulsions**. Berlin: Springer, 2006.

BRYANT, C. M.; MC CLEMENTS, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold set gels derived from heat denatured whey. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, p.143-151, 1998.

BURKE, L. Sports foods: A new market for the food industry. **Food Austr.**, p.52:405, 2000.

BURTON, J.; SKUDDER, P.; Whey protein.UK Patent Applications, 2188526 A, 1987.

CALVO, M. M., LAW, A. J. R., LEAVER, J. Heat-induced interactions between serum albumin, immunoglobulin, and k-casein inhibit the primary phase of renneting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2823–2827, 1995.

CAMPOS M., P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R. Formulário dermocosmético. São Paulo: **Tecnopress Editora e Publicidade**, v.2, p.37-38, 1999.

CÁNOVAS, G.V.B; MARTÍN, O.; BENDICHO, S. Milk processing by high intensity pulsed electric fields. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.195-204, 2002.

CAPITANI, C. D.; PACHECO, M. T. B.; GUMERATO, H. F. *et al.* Milk whey protein recuperation by coacervation with polysaccharide. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.11, p.1123-1128, 2005.

CHEN, J.; DICKINSON, E.; LANGTON, M. *et al.* Mechanical properties and microstructure of heat – set whey protein emulsion gels: effect of emulsifiers. *Lebensm-Wiss-U-Technologie*, **Food Science and Technology**, v.33, p.299-307, 2000.

CHERKAOUI, S.; DOUMENC, N.; TACHON, P.; NEESER, J. R., VEUTHEY, J. L. Development of a capillary zone electrophoresis method for casein glycomacropeptide determination. **Journal of Chromatography A**, v.790, p.195-205, 1997.

CHRYSINA, B. D.; BREW, K.; ACHARYA, K. R. Crystal structures of apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2- Å resolution reveal an effect of calcium and interlobe interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.37021-7029, 2000.

COOLBEAR, K. P.; ELGAR, D. F.; AYERS, J. S. Profiling of genetic variants of bovine k casein macropeptide by electrophoretic and chromatographic techniques. **International Dairy Journal**, v.6, p.1055-1068, 1996.

CREAMER, L.K.; WHEELOCK, J. V.; SAMUEL, D. The distribution of glyco-k-casein and carbohydrate-free k-casein between large and small bovine casein micelles, and its implication in micelle structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v.317, p.202-208, 1973.

DA FONSECA, V. C. **Elaboração de molho para salada com soro de queijo minas frescal estabilizado por combinações ternárias de alginato de propileno glicol, goma xantana e carboximetilcelulose**. Dissertação de mestrado em tecnologia de alimentos, UFPR, Curitiba, 2008.

DA SILVA, C. A. S. **Partição do glicomacropeptídeo usando sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, UFV, MG, 2007.

DAALI, Y.; CHEKAOUI, S.; & VEUTHEY, J. L. Capillary electrophoresis and high performance anion exchange chromatography for monitoring casein glycomacropeptide sialylation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, p.849-856, 2001.

DAVISCO FOODS INTL., Eden Prairie, Minnesota, U.S.A., 2012. Disponível em: www.daviscofoods.com/specialty/glyco.html. Acesso em: 20/04/2012.

DE WIT, J. N.; KLARENBECK, G.; ADAMSE, M. Evaluation of functional properties of whey protein concentrates and whey protein isolates. 2. Effects of processing history and composition. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.40, p.41-56, 1996.

DOLZM.; HERNANDEZ, M. J.; DELEGIDO, J. Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 421-427, 2008.

DONATO, I.; SCHMITT, C.; BOVETTO, L.; ROUVET, M. Mechanism of formation of stable heat-induced β -lactoglobulin microgels. **International Dairy Journal**, v.19, n.5, p.295-306, 2009.

DONATO, L.; KOLODZIEJCZYK, E.; ROUVET, M. Mixtures of whey protein microgels and soluble aggregates as building blocks to control rheology and structure of acid induced cold-set gels. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n.4, p.734-742, 2011.

DRACZ, S. **Desenvolvimento de um novo método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite**. Dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, UFV, Viçosa, MG, 1996.

DURR, J. W. **Segurança alimentar e qualidade do leite**. In: DUARTE, V. et al. (Eds). O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável. Juiz de Fora: Embrapa, p.539-546, 2002.

DZIUBA, J.; MINKIEWICZ, P. Influence of glycosylation on micelle-stabilizing ability and biological properties of C-terminal fragments of cow's k-casein. **Int. Dairy J.**, v.6,p.1017-1044, 1996.

ENDRESS, H. U.; DOSCHL-VOLLE, C.; DENGLER, K. Rheological Methods to Characterize Pectins in Solutions and Gels. In: VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. (Eds), **Progress in Biotechnology: Pectins and Pectinases**. Amsterdam: Elsevier, v. 14, p. 407-423, 1996.

ETZEL, M. Manufacture and use of dairy protein fractions. **J. Nutr. Inst. of Medicine**, 2005.

FARIAS, M. E.; MARTINEZ, M. J.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. **International Dairy Journal**, v.20, p.79-88, 2010.

FERRON-Baumy, C.; MOLLE, D., GARRIC, G. & MAUBOIS, J.L. Characterisation of caseinomacropeptide released from renneted raw and UHT treated milks. **Lait**, v.72, p.165-173, 1992.

FERRY, J. D. Protein gels. **Adv. Protein Chem.**, v.4, p.61–76, 1948.

FITZSIMONS, S. M.; TOBIN, J. T.; MORRIS, E. R. Synergistic binding of konjacglucomannan to xanthan on mixing at room temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 36-46, 2008.

FOLIN, O.; WU, H. A simplified e improved method for the determination of sugar. **Journal Biol. Chemistry**, v.41, p.367-374, 1920.

FOX, P. F. The major constituents of milk. In: SMIT, G. **Dairy processing – Improving quality**. Boca Raton: CRC Press, p. 5-38, 2000.

FREITAS, R. A.. **Estrutura e interações entre galactoxiloglucanas e amidos**, pg130. Tese de Doutorado em Ciências-Bioquímica, UFPR, Curitiba, PR, 2003.

FU, X.; CHEN, X.; WEN, R.; HE, X.; SHANG, X.; LIAO, Z.; YANG, L. Polyethylene-octene elastomer/starch blends: miscibility, morphology and mechanical properties. **J Polym Res**, v.14, p.297-304, 2007.

FUKUDA, S. P.; ROIG, S.M.; PRATA, L.F. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. **Lait.**, v.84, p.501-512, 2004.

GEOFFREY O. REGESTER; GEOFFREY W. SMITHERS. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Division of Food Processing, Dairy Research Laboratory, Highett, Victoria, 3190, Australia. Seasonal Changes in the β -Lactoglobulin, α -Lactalbumin, Glycomacropeptide and Casein Content of Whey Protein Concentrate. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 796-802, 1991.

GOFF, D. **Dairy Science and Technology Education**. University of Guelph, Canadá. Disponível em: www.foodsc.uoguelph.ca/dairyedu/home.html. Acesso em: 9/03/2011.

GONZALEZ, F. D. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação**.in: GONZALEZ, F. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre, RS: **Gráfica UFRGS**, p.5-21, 2001.

GOSAL, W. S.; CLARK, A. H.; PUDNEY, P. D. A.; ROSS-MURPHY, S. B. Novel amyloid fibrillar networks derived from a globular protein: β -lactoglobulin. **Langmuir**, v.18, p.7174-7181, 2002.

GOULD, W.A. Tomato production: processing & technology. 3.ed. **CTI publications**, 1992.

GRAHAM, N. B.; CAMERON, A. Nanogels and microgels: the new polymeric materials playground. **Pure & Applied Chemistry**, v.70, p.1271-1275, 1998.

GUIZANI, N. Postharvest handling of milk In: RAHMAN, M. S. **Handbook of food preservation**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 203-211, 2007.

HAERTLE, T.; CHOBERT, J. M. Recent progress in processing of dairy proteins: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v.23, p.367-407, 1999.

HENDERSON, A.S.; BLACK, A. L.; & BROOKS, G. A. Leucine turnover and oxidation in trained rats during exercise; **Am. J. Physiol.**, v.249, p.137-44, 1985.

HOBMAN, P. G. **Ultrafiltration and manufacture of whey protein concentrates**.In J. G. Zadow (Ed.), Whey and lactose processing (pp.195-230). London: Elsevier Applied Science, 1992.

IDOTA, T.; KAWAKAMI, H.; NAKAJIMA, I. Bifidobacterium growth promoting activity effect on N-acetylneuraminic acid containing substances. **Biosci. Biotech. Biochem**, v.58, p.1720-1722, 1994.

JENNESS, R.; Holt, C. Casein and lactose concentration in milk of 31 species are negatively correlated. **Experientia**, v. 43, p.1015-1018, 1987

JUNG, J.M.; SAVIN, G.; POUZOT, M. *et al.* Structure of heat-induced β -lactoglobulin aggregates and their complexes with sodium-dodecyl sulfate. **Biomacromolecules**, v.9, p.2477-2486, 2008.

KAVANAGH, G. M.; ROSS-MURPHY, S. B. Rheological Characterization of Polymer gels. **Progress in Polymers Science**, v.23, p. 533-562, 1998.

KAWAKAMI, H.; KAWASAKI, Y. *et al.* Determination of k-casein glycomacropeptide by high performance liquid chromatography without trichloroacetic acid pretreatment. **Milchwissenschaft**, v.47, p.688-693, 1992.

KAWASAKI, Y.; DOSAKO, S.; SHIMATANI, M.; IDOTA, T. inventors; Snow Brand Milk Products Co., Ltd., assignee. Process for producing K-casein glycomacropeptides. U. S. **patent 5,280,107**, 1994.

KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, M.; TANIMOTO, S. *et al.* pH dependent molecular weight changes of Kappa casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v.48, p.191-196, 1993.

KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, M.; TANIMOTO, M.; DOSAKO, S.; TOMIZAWA, A.; KOTAKE, M. pH-dependent molecular weight changes of k-casein glycomacropeptide and its preparation by ultrafiltration. **Milchwissenschaft**, v.48 (4), p.191-196, 1996.

KREUB, M.; STRIXNER, T. *et al.* The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1818-1826, 2009.

KUHN, K.R.; CAVALLIERI, A.L.F. *et al.* Cold-set whey protein-flaxseed gum gels induced by mono or divalent salt addition. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1302-1310, 2011.

KUTSCHMANN, E. M. Rheological analysis of the stability of pharmaceutical suspensions. **Manufacturing chemist**.v. 74, p. 50-51, 2003.

LAPASIN, R.; PRICIL, S. **Rheology of industrial polysaccharides: theory and applications**. Glasgow, London: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall. 1ª Edição, p. 620, 1995.

LARSON, R. G. **The structure and rheology of complex fluids**. New York: Oxford, 1999.

LEITE BRASIL. **Boas perspectivas para produtores de leite**. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/leite-brasil-boas-perspectivas-para-produtores-de-leite-77948n.aspx>. Acesso em: 16/02/2012.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm**, v.250, n. 1, p. 35-44, ago. 2001.

LI, E. W.; MINE, Y. Immunoenhancing effects of bovine glycomacropeptide and its derivatives on the proliferative response and phagocytic activities of human macrophage like cells, U937. **Journal of Agricultural and Food Science**, v.52, p.2704-2708, 2004.

LIESKE, B.; KONRAD, G., & KLENSCHMIDT, The Isolations of caseinomacropeptide from rennet whey by a multistage ultrafiltration process. I. Studies in the apparent

molecular weight of caseinomacropeptide as a function of pH. **Milchwissenschaft**, v.59, p.172-175, 2004.

LIPPACHER, A.; MULLER, R. H.; MADER, K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 561-567, 2004.

LOFGREN, C.; HERMANSSON, A-M. Synergistic Rheological Behaviour of mixed HM/LM Pectin Gels. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 480-486, 2007.

LOPEZ-FANDINO, R. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. **International Dairy Journal**, v.16, p.1119-1131, 2006.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v.30, p.529-542, 1997.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BONTEMPO, E.M.B.G.; LEONARDI, G.R. **Formulário Dermocosmético**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade, v.2, p.37-38, 1999.

MALKIN, Y. A. **Rheology Fundamentals**. Toronto: Chem Tec, 1994.

MALKOSKI, M. *et al.* Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine Milk. **American society for microbiology**, v.45, n.8, p.2309-2315, 2001.

MARSHALL, S. C. Casein macropeptide from whey: A new product opportunity. **Food Res. Quar.**, v.51, p.8691, 1991.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. Ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 153-476, 1993.

MARTIN-DIANA, A. B.; FRAGA, M. J.; FONTECHA, J. *et al.* Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. **European Food Research and Technology**, v.214, p.282-286, 2002.

MARTINEZ, M. J.; CARRERA, S. C.; PILOSOFF, A. M. R. Interactions in the aqueous phase and adsorption at the air water interface of caseinoglycomacropeptide (CMP) and β -lactoglobulin mixed systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.68, p.39-47; 2009.

MARTINEZ, M. J.; FARIAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. Casein glycomacropeptide pH-driven self-assembly and gelation upon heating. **Food Hydrocolloids**, n. XXX, p.1-8, 2010.

MARTINEZ, M. J.; FARIAS, M. E.; PILOSOFF, A. M. R. The dynamics of heat gelation of casein glycomacropeptide - β -lactoglobulin mixtures as affected by interactions in the aqueous phase. **International Dairy Journal**, v. 20, p.580-588, 2010.

MASKAN, M.; GOGUS, F. Effect of sugar on the rheological properties of sunflower oil-water emulsion. **Journal of Food Engineering**, v. 43, p. 173-177, 2000.

MCCANN, K. B.; LEE, A.; WAN J. Antiviral activity of milk proteins. **Aust. J. Dairy Technol.**, v.52, p. 109-18, 2001.

MEHALEBI, S.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Light scattering study of heat denatured globular protein aggregates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, p.129-135, 2008.

MESSENS, W.; VAN CAMP, J.; HUYGHEBAERT. The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.107-112, 1997.

MIKKELSEN, T. L.; FROKIAER, H.; TOPP, C. *et al.* Caseinomacropeptide self-association is dependent on whether the peptide is free or restricted in k-casein. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4228-4238, 2005.

MIRALLES, B.; ROTHBAUER V.; MANSO M. A. *et al.* Improved method for the simultaneous determination of whey proteins, caseins and para-k-casein in milk and dairy products by capillary electrophoresis. **J. Chrom. A.**, v.915, p.225-230, 2001.

MOLLE, D.; LEONIL, J. Quantitative determination of bovine k casein mac ropeptide in dairy products by liquid chromatography/electrospray coupled to mass spectrometry (LC ESI/MS) and liquid chromatography/electrospray coupled to tandem mass spectrometry (LC ESI/MS/MS). **International Dairy Journal**, v.15, p.419-428, 2005.

MORR, C. V.; SEO, A. Fractionation and characterization of glycomacropeptide from caseinate and skim milk hydrolysates. **J. Fd. Sci.**, v.53, p.80-87, 1988.

MORR, C.; HA, E. W. Whey protein concentrates and isolates processing and functional properties critical reviews. **Food Sci. Nutrition**, v.33, n.6, p.41-476; 1993.

MORRIS, E. R. Polysaccharide Rheology and In-Mouth Perception. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker, 1995. P. 517-546.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. **Gums and Stabilizers for the Food Industry**, v. 2, p. 57-58, 1984.

MOTT, L. R. **Mecânica de fluidos aplicada**. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S. A., 1996.

MULVIHILL, D. M.; KINSELLA, J. E. Gelation characteristics of whey proteins and β -lactoglobulin. **Food Technol.**, v.41, p.102-111, 1987.

NABET, P.; LINDEN, G. Constituants bioactifs in lait, nutrition et santé. **Tec & Doc**, p. 169-87, Paris, 2001.

NAÉ, H. N. Introduction to rheology. In: **Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries** (edited by D. Laba). P. 9-33. New York: Marcel Dreker, 1993.

NAKANO, T.; OZIMEK, L. Gel chromatography of glycomacropeptide (CMP) from sweet whey on Sephacryl S 200 at different pH's and Dephadex G 75 in 6 M guanidine hydrochloride. **Milchwissenschaft**, v.53, p.629-633, 1998.

NISHINARI, K.; ZHANG, H.; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 5, p. 195-201, 2000.

OLDFIELD, D. J.; SINGH, H., TAYLOR, M. *et al.* Kinetics of denaturation and aggregation of whey protein in skim milk heated in an ultra-high temperature (UHT) pilot plant. **International Dairy Journal**, v.8, p.311-18, 1998.

OLIVA, Y.; ESCOBAR, A.; PONCE, P. Caseinomacropeptideo bovino: una alternative para la salud. **Rev. Salud Anim.**, v.24, n.2, p.73-81, 2002.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. vol.1, Porto Alegre: Artmed, 2005.

OTTE, J.; SCHUMACHER, E.; IPSEN, R. *et al.* Protease-induced gelation of unheated and heated whey proteins: effects of pH, temperature, and concentrations of protein, enzyme and salts. **International Dairy Journal**, v.9, n.11, p. 801-912, 1999.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S. *et al.* Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.333-338, 2005.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F. **Físico-química do Leite e Derivados – Métodos Analíticos**. 2 ed. Juiz de Fora: EPAMIG, p.234, 2001.

PIMENTA, F. M. V. **Efeitos do consumo de hidrolisado das proteínas do soro lácteo no desempenho físico e no metabolismo protéico do rato exercitado**. Dissertação de mestrado, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RAO, M. A. **Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid foods**. In: RAO, M. A.; STEFFE, J. F. *Viscoelastic Properties of Foods*. New York: Elsevier Applied Science, p. 207-231, 1992.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications**. New York: Aspen Publishers, 1999.

REES, D. A. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels networks. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 24, p. 267-332, 1969.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, v.3, n.17, p.20-27, 2002.

ROJAS, S. A.; GOFF, H. D.; SENARATNE, V. *et al.* Gelation of commercial fractions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin. **Int. Dairy J.**, v.7, n.1, p.79–85, 1997.

ROY, B. D.; TARNOPOLSKY, M. A.; MACDOUGALL, J. D. *et al.* Effect of glucose supplement timing on protein metabolism after resistance training. **J. Appl. Physiol.**, v.82, p.1882-8, 1997.

ROY, M. K. Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells; **J. Dairy Sci.**, v.85, p.2065-74, 2002.

SARON, M. L. G. **Aproveitamento do permeado do soro de leite bovino através da transformação da lactose em lactulose e como ingrediente para meios de cultura de bactérias probióticas.** Dissertação de mestrado, FEA, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

SCHMITT, C. ; BOVAY, C.; VUILLIOMENET, A.; ROUVET, M.; BOVETTO, L. Influence of protein and mineral composition on the formation of whey protein heat-induced microgels. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.558-567, 2011.

SCHMITT, C.; BOVAY, C.; VUILLIOMENET, A. M. *et al.* Multiscale characterization of individualized β -lactoglobulin microgels formed upon heat treatment under narrow pH range conditions. **Langmuir**, v.25, p.7899-7909, 2009.

SCHMITT, C.; BOVAY, C.; ROUVET, M. *et al.* Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties. **Langmuir**, v.23, p.4155-4166, 2007.

SCHOTT, H. **Reologia.** In: Remington Pharmacia; 19 ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, p.426-455, 1995.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos.** Tradução e adaptação: Cheila Mothé et al. São Paulo: Artliber, 2006.

SEMENOVA, M. G. Thermodynamic analysis of the impact of molecular interactions on the functionality of food biopolymers in solution and in colloidal systems. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.23-45, 2007.

SGARBIERI, V. C. Physiological-functional properties of milk whey proteins. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.397-409, out./dez. 2004.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos.** São Paulo: Varela, p.517, 1996.

SHARMA, P. J. Recovery and fractionation of proteins from cheese whey using a porous silica based ion exchange medium. **Chem. Ind.**, p.810-814, 1993.

SILVA HERMANDEZ, E.; NAKANO, T.; OZIMEK, L. Isolation and analysis of k casein glycomacropeptide from goat sweet whey. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2034-2038, 2002.

SILVA, C.A.S.; COIMBRA, J.S.R.; ROJAS, E.E.G.; TEIXEIRA, J.A.C. Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v.44, p.1213-1218, 2009.

SMITHERS, G. W.; BRADFORD, R. S.; REGESTER, G. O. *et al.* New casein protein products for the food industry: physical, chemical and enzymatic manipulation of milk. **Food Aust.**, v.43, p.252-254, 1991.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**: leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos. 2.ed. Zaragoza: Acriba, 1991.

STAN, E. Y.; & CHERAIKOV, M. P. The heterogeneity of casein glycomacropeptide. **Voprosy Meditsinskoi Khimii**, v.20, p.644-648, 1974.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2.e d. Michigan: Freeman, 1996.

SWAISGOOD, H. E. **Chemistry of milk proteins**. In: Fox P.F. (Ed.). Developments in dairy chemistry. I. Proteins. New York: p.1-60, Applied Scienc., 1982.

TAKAHASHI, N.; ASAKAWA, S.; DOSAKO, S. *et al.* Hypoallergenic nutritive composition. French Pat. Appl., FR 2677850 A1, 1992.

TANIMOTO, M.; KAWASAKI, Y. *et al.* Process for producing k-casein glycomacropeptides. European Patent Application 0393850 A2, 1990.

TAYLOR, C.M.; WOONTON, B.W. Quantity and carbohydrate content of glycomacropeptide fractions isolated from raw and heat-treated milk. **International Dairy Journal**, v.19, p. 709-714, 2009.

THOMA, C.; KRAUSE, I.; KULOZIK, U. Precipitation behaviour of caseinomacropeptides and their simultaneous determination with whey proteins by RP-HPLC. **International Dairy Journal**, v.16, p.285-293, 2006.

THOMA-WORRINGER, C.; SORENSEN, J.; LOPEZ-FANDIÑO, R. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1324-1333, 2006.

TOLKACH, A.; KULOZIK, U. Fractionation of whey proteins and caseinomacropeptide by means of enzymatic crosslinking and membrane separation techniques. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.13-20, 2005.

TIPTON, K.D.; FERRANDO, A.A.; STUART, M. P. *et al.* Post exercise net protein synthesis in human muscle from orally administered aminoacids. **Am. J. Physiol.**, v.276, p.628-634, 1999.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3 ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 206 p., 2008.

TULLIO, L. T. **Isolamento e caracterização do glicomacropeptídeo do soro de leite**; 81 p. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2007.

VAN LOON, L. J. C. *et al.* Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.72, p.96-105, 2000.

VASBINDER, A.J.; ROLLEMA, H.S.; DE KRUIF, C.G. Impaired rennetability of heated milk: study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *J. Dairy Sci.*, v.86, p.1548–1555., 2003.

VEITH, P.D., REYNOLDS, E. C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.831-840, 2004.

VREEMAN, H. J.; VISSER, S.; SLANGEN, C. J. *et al.* Characterization of bovine k-casein fractions and the kinetics of chymosin-induced macropeptide release from carbohydrate-free and carbohydrate-containing fractions determined by high-performance gel-permeation chromatography. **Biochem. J.**, v.240, p.87-97, 1986.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A. *et al.* **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, p.730, 2001

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y Física Lactológica**. Zaragoza: Acribia,

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**, 2 ed. Boca Raton, Fla: CRC/Taylor & Francis, 2006.

WANG, Q. **Application of low intensity ultrasound to characterize the microestructure of model food systems**. PhD Thesis, Technischen Universita Munchen, Germany, 2007.

YOGMAN, M. W.; ZEISEL, S. H.; ROBERTS, C. Assessing effects of serotonin precursors on newborn behaviour; **J. Psychiatric Res**, v.17, n. 2, p.123-133, 1982.

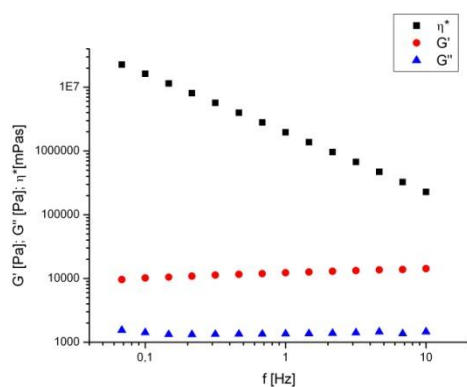
YVON, M. *et al.* Effects of caseinomacropeptide (CMP) on digestion regulation. **Reproduction Nutrition Development**, v.34, p.527-537, 1994.

ZYDNEY, L.A. Protein Separations Using Membrane Filtration: New Opportunities for Whey Fractionation. **Dairy Journal**, v. 8, p.243-250,1998.

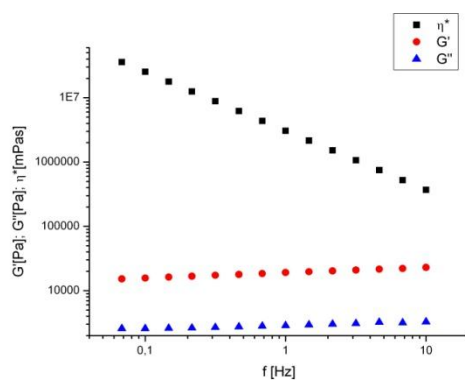
APÊNDICE

a) Dados Experimentais de Reologia:

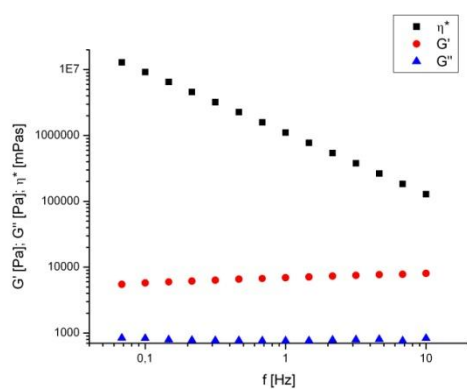
1



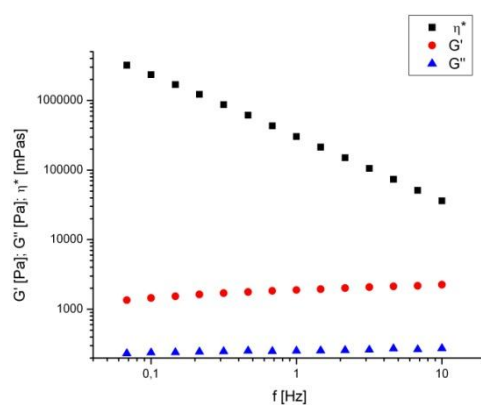
4



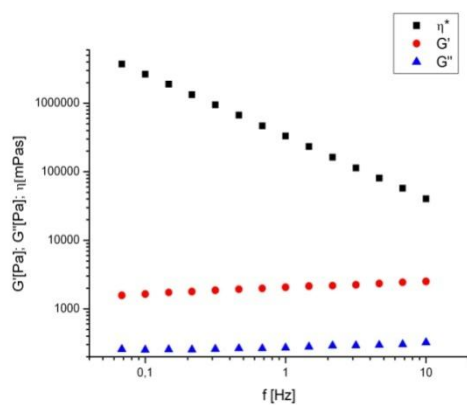
2



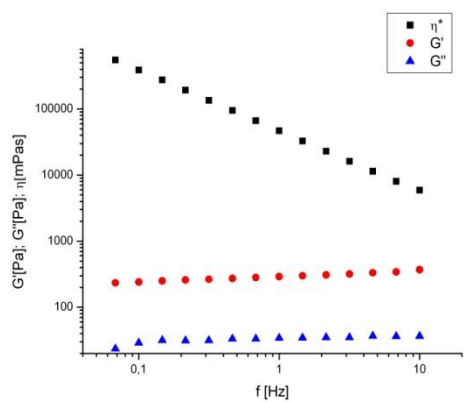
5

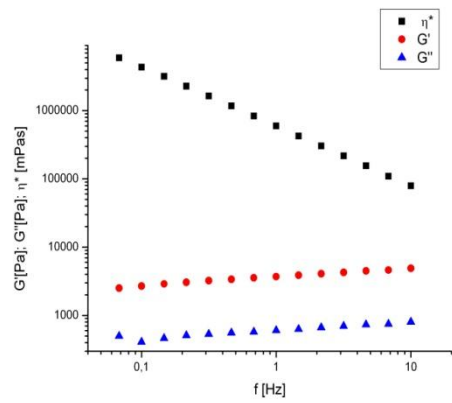
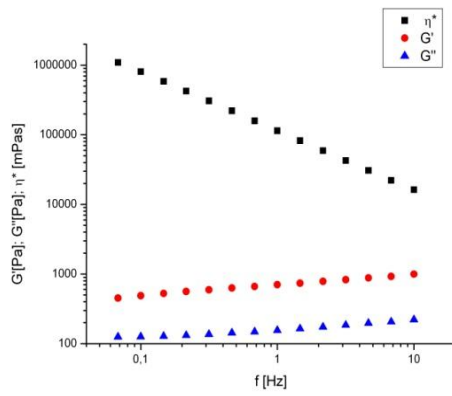
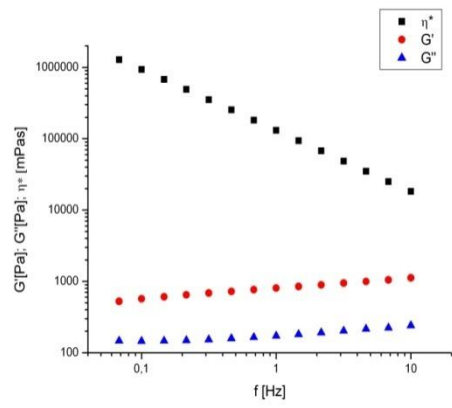
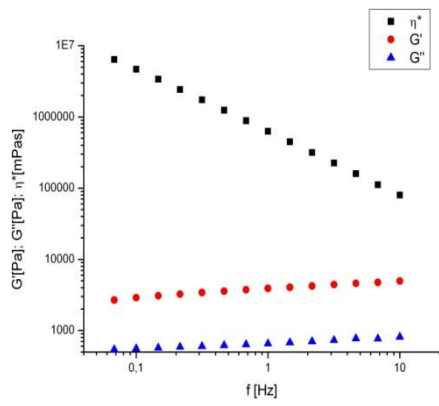
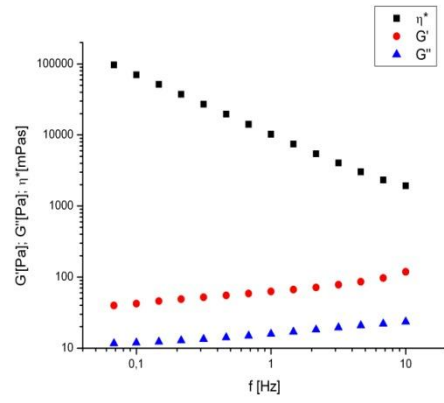
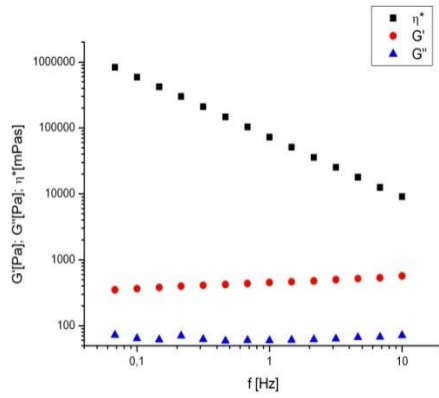


6

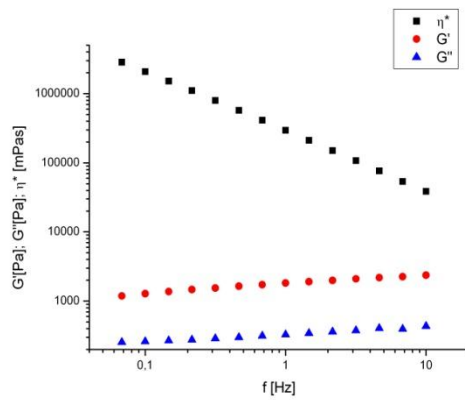


3

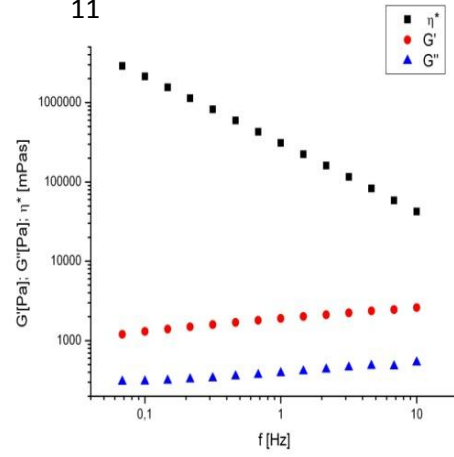




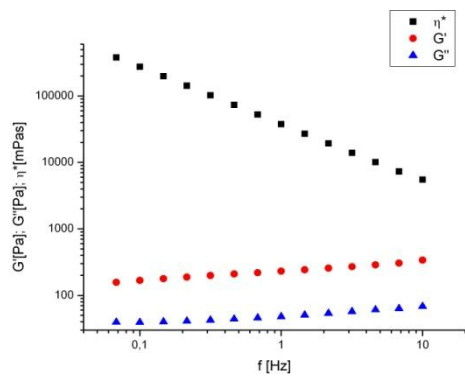
13



11



14



16

